

**A Ribavirin és az Inozitol-hexakiszfósfát
daganatellenes hatásának vizsgálata: a sejtélettani és
génexpressziós háttér feltérképezése**

Készítette: **Kökény Szabolcs**



ELTE TTK Biológia Doktori Iskola
Molekuláris, Sejt- és Neurobiológiai Doktori Program

Témavezető: Prof. Dr. Oláh Edit
Doktori Program vezetője: Prof. Dr. Sass Miklós
Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Erdei Anna

Országos Onkológiai Intézet,
Molekuláris Genetikai Osztály
2009

TARTALOMJEGYZÉK

	RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	1
1	BEVEZETÉS	3
1.1	A rák, mint genetikai betegség	3
1.2	Az onkogének szerepe a daganatok kialakulásában	5
1.3	A tumorszuppresszor gének szerepe a daganatok kialakulásában	9
1.4	Kemoterápiás és genomikai megközelítések	14
1.4.1	A Ribavirin	16
1.4.2	Az IP6	20
2	CÉLKITŰZÉSEK	23
3	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	25
3.1	Sejttenyészetek fenntartása	25
3.2	A sejttenyészetek kezelése Ribavirinnel és IP6-tal	25
3.3	Baktériumtörzsek és vektorok	26
3.4	Gélelektroforézisek	27
3.5	Plazmidizolálás	27
3.6	Polimeráz láncreakció (PCR)	28
3.7	DNS szekvenálás	29
3.8	Teljes RNS izolálás sejttenyészetből	30
3.9	Radioaktív próba előállítása in vitro transzkripcióval	31
3.10	Expressziós vizsgálatok Northern hibridizációval	31
3.11	Expressziós vizsgálatok ribonukleáz védelmi reakcióval (RPA)	32
3.12	<i>Microarray</i> vizsgálatok	34
3.13	Reverz transzkripció	36
3.14	Kvantitatív <i>real-time</i> PCR vizsgálatok (Q-RT-PCR)	36
3.15	Taqman kis-denzitású génexpressziós <i>array</i> (TLDA)	37
3.16	A TLDA eredmények szoftveres és statisztikai értékelése	38

4	EREDMÉNYEK	40
4.1	Sejtélettani hatásvizsgálatok	40
4.1.1	A Ribavirin kezelés sejtélettani hatásainak vizsgálata	40
4.1.2	Az IP6 kezelés sejtélettani hatásainak vizsgálata	43
4.2	Génexpressziós profilmeghatározások	46
4.2.1	Génexpresszió meghatározása Northern hibridizációval	46
4.2.2	Génexpresszió meghatározása RPA módszerrel	50
4.2.3	Génexpresszió meghatározása, szignálútvonalak változásának követése <i>microarray</i> technológiával	54
4.2.4	Génexpresszió meghatározása kvantitatív valós-idejű PCR reakcióval	59
4.2.4.1	A MYC onkogén expressziójának meghatározása Ribavirinnel kezelt K562 leukémia sejtekből izolált mintákon	59
4.2.4.2	A kis dóziszú Ribavirin kezelés hatékonyságának vizsgálata, a sejtélettani hatások és a <i>microarray</i> eredmények validálása	61
4.2.4.3	Az IP6 kezelés hatékonyságának vizsgálata, a sejtélettani hatások és a <i>microarray</i> eredmények validálása	63
4.2.4.4	Taqman kis-denzitású génexpressziós <i>array</i> (TLDA) kísérletek a nagy dóziszú Ribavirin kezelés és a sejtélettani hatások hatékonyságának meghatározására	65
5	AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	69
5.1	Sejtélettani vizsgálatok: a Ribavirin és az IP6 kezelés hatása daganatsejteken	69
5.1.1	A Ribavirin kezelés	69
5.1.2	Az IP6 kezelés	71
5.2	Génexpressziós profilmeghatározások	73
5.2.1	Az alkalmazott génexpressziós módszerek áttekintése	73
5.2.2	Az IP6 kezelés által kiváltott génexpressziós változások	76
5.2.3	A Ribavirin kezelés által kiváltott génexpressziós változások	80

6	ÖSSZEFOGLALÁS	89
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	93
	A DOKTORI ÉRTEKEZÉS RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA	94
	SUMMARY	95
	IRODALOMJEGYZÉK	97
	MELLÉKLETEK	114

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

CML	Krónikus mieloid leukémia (<i>Chronic myeloid leukemia</i>)
DTT	Ditio-treitol
EDTA	Etilén-diamin-tetraacetát
EGFR	Epidermális növekedési faktor receptor (<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
FDA	Amerikai Élelmiszer és Gyógyszeradminisztrációs Hivatal (<i>U.S. Food and Drug Administration</i>)
GAPDH	Glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GTE	Glükóz-Tris-EDTA
GDP	Guanozin-difoszfát
GMP	Guanozin-monofoszfát
GTP	Guanozin-trifoszfát
HCV	Hepatitisz C vírus
HNPCC	Örökletes nem polipózisos kolorektális daganat (<i>Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer</i>)
IC ₅₀	50%-os sejtszaporodás-gátlást elérő szerkoncentráció (<i>Inhibitory Concentration 50</i>)
IMP	Inozitol-monofoszfát
IP3	Inozitol-triszfoszfát
JPS	Juvenilis polipózis szindróma (<i>Juvenile Polyposis Syndrome</i>)
LB	Luria-Bertani (oldat)
MGB	Kis-árok kötő (<i>minor groove binder</i>) Q-PCR próba
MOPS	3-(N-morfolino-)propánszulfonsav
MuLV	Egér leukémia vírus (<i>murine leukemia virus</i>)
NAD	Nikotinamid-adenin dinukleotid

NHEJ-DSR	DNS törés javításának egyik mechanizmusa (<i>nonhomologous end joining double strand break repair</i>)
NK	Természetes ölősejtek (<i>natural killer</i>)
PBS	Foszfát tartalmú sóoldat (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PDGF	Vérlemezből származó növekedési faktor (<i>Platelet Derived Growth Factor</i>)
PI4-kináz	Foszfatidil-inozitol-4-kináz
PIP5-kináz	Foszfatidil-inozitol-4-foszfát-5-kináz
PIPES	Piperazin-N,N'-bisz(2-etánszulfonsav)
PLC	Foszfolipáz-C
RMP	Ribavirin-monofoszfát
RNáz	Ribonukleáz
SDS	Nátrium-dodecil-szulfát (<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>)
Sol. D	D-oldat RNS izoláláshoz (<i>Solution D</i>)
TAD	Tiazofurin-adenin dinukleotid
TBE	Tris-bórsav-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propándiol
WHO	Egészségügyi Világszervezet (<i>World Health Organization</i>)
XMP	Xantin-monofoszfát

1 BEVEZETÉS

1.1 A rák, mint genetikai betegség

A nemzetközi WHO felmérések alapján a rákos megbetegedések száma 2020-ra a jelenlegihez képest másfélszeresére nőhet, azaz évente 15 millió embernél diagnosztizálhatják újonnan a kórt. Az Eurostat szerint a 2005-ös év folyamán a rákos megbetegedéseknek 7,6 millió áldozata volt világviszonylatban, egy 2000-ben végzett összehasonlítás értelmében Magyarország a rák következtében történő elhalálozások tekintetében az első helyen állt Európában. Ez az elrettentő statisztikai adat is egyértelművé teszi azt az igényt, hogy a rákkutatás – mint a daganatos megbetegedések megelőzésének és hatékony kezelésének egyik alappillére – kiemelt fontosságú kell hogy legyen hazánkban is (Eurostat, WHO).

Ma már elfogadott, hogy a rák kialakulása mögött genetikai tényezők állnak. Arnold már 1879-ben leírta az ezt alátámasztó első megfigyelést, miszerint a tumorsejtekben a normális sejtekhez képest sokkal gyakrabban figyelhetők meg rendellenes sejtosztódások (Graves, 2000). A XX. század elején Theodor Boveri, a kromoszómaelmélet megalkotója vetette fel először azt az elképzelést, hogy a daganatok kialakulásában alapvetőek a kromoszómaaberrációk (Boveri, 1914; hivatkozva Balmain, 2001). A kép azóta sokat finomodott, és elsősorban a molekuláris genetika robbanásszerű fejlődésének köszönhetően ma már nagyon sok gén-, illetve genom szintű változást ismerünk, amelyek szerepet játszanak a malignus transzformációban (Oláh, 2004, 2006, 2009; Kopper és Tímár, 2007).

Sok helyen és sokszor elhangzik a kijelentés, miszerint a rák egy modern, civilizációs betegség. A daganatok gyakoriságát tekintve valóban helyes ez a megállapítás, a betegség újkeletűségét tekintve azonban nem érvényes. A tumoros elváltozások „evolúciós karrierje” megközelítőleg 150 millió évvel ezelőtt alakult ki, mert az eddigi legrégebbi, valóban tumorosnak tekinthető elváltozást – egy hemangioma nyomait – egy Jura korabeli dinoszaurusz csonton találták meg (Greaves, 2000). Feltételezik azonban, hogy a sejtek rosszindulatú burjánzásainak megjelenése régebbre tehető, evolúciós léptékben mérve egyidősek a többsejtű organizmusok kialakulásával (Greaves, 2000; Williams, 2001). Mindezek alapján

tehát a rák, mint sejtélettani elváltozás, a többsejtű élőlények evolúciósan meglehetősen régi örökségének tekinthető.

Az egészséges szervezetben a sejteket a növekedést serkentő és gátló folyamatok szigorú egyensúlya jellemzi, amely csak bizonyos fiziológiás esetekben, – de akkor is nagyon szabályozottan és összehangoltan – tolódhat el a sejtproliferáció irányába (pl. embriogenezis, a szövetet ért sérülések gyógyulása, immunválasz kialakulása, stb). A daganatsejtek kialakulásakor ezek a szabályozó folyamatok sérülnek, és végső soron ez vezet a malignus transzformáció kialakulásához.

A rákos, rosszindulatú fenotípus létrejötte minden esetben egy többlépcsős folyamat eredménye, egy olyan klonális evolúcióé, amelynek során a megjelenő újabb és újabb mutációk/elváltozások újabb és újabb, többek között egyre növekvő proliferatív potenciállal rendelkező szubklónok kialakulását eredményezik (Nowell, 1976; Sikora és Pandha, 1997). A daganatok klonális eredetére nézve több bizonyíték is létezik, és több olyan genetikai elváltozást (pl. pontmutációt vagy kromoszóma transzlokációt) is azonosítottak, amelyek alapvető szerepet játszanak egy adott szerv bizonyos daganattípusának kialakulásában, így tumormarkerként fontos diagnosztikai szerepet töltenek be (Vogelstein és mtsai, 1987; Tkachuk és mtsai, 1990; Sikora és Pandha, 1997; Knudson, 2000). A tumorokra jellemző genetikai instabilitás miatt azonban nem lehet az adott genetikai elváltozást vagy variánst a többlépcsős tumorigenezis egyik lépcsőfokaként leírni, hiszen alaposabb vizsgálatok nélkül nehéz eldönteni, vajon az adott elváltozás a daganat kialakulásának mennyiben oka vagy következménye (Devilee és mtsai, 2001).

Kétségtől van azonban a géneknek – amelyek közül eddig 291 gént „rákgén”-ként azonosítottak – két olyan csoportja, a proto-onkogének és a tumorsuppresszor gének, amelyek meghibásodása alapvető szerepet játszik a daganatok kialakulásában (Stratton és Futreal, 2004).

1.2 Az onkogének szerepe a daganatok kialakulásában

A daganatok kialakulásáért felelős csoportot alkotó onkogének olyan celluláris proto-onkogénekből származnak, amelyek az egészséges sejt szabályozott növekedését, a sejtosztódáshoz vezető folyamatokat pozitív módon szabályozzák, vagyis a sejtproliferáció agonistái.

Felfedezésük a funkciójukban valamilyen módon zavart szenvedett formájukhoz, az onkogénekhez vezethető vissza. Az onkogének jelenlétét eredetileg daganatképződést okozó vírusokban mutatták ki, majd bizonyítást nyert, hogy a vírusok által hordozott onkogének a gazdasajt génjeinek megváltozott leszármazottai (Stehelin és mtsai, 1976; zur Hausen, 1991).

A humán daganatképződés során a proto-onkogének aktiválódnak és onkogénné alakulnak, és így aktiválódott állapotban vesznek részt a daganatképzésben, hiszen felgyorsítják a sejtek szaporodási folyamatát, amely szabályozatlan sejtosztódáshoz, végül pedig rákképződéshez vezethet. A transzformációra képes onkogénné váló átalakulásnak többféle mechanizmusa ismert, ezek vagy az adott gén szerkezetét (pontmutáció, transzlokáció, delécio, inszerció), vagy pedig a gén kifejeződését (génkópiaszám és génexpresszió növekedése) érintő változások.

A mutációs változások iskolapéldáját a RAS géncsaládban találjuk. Ezeket a géneket elsőként patkány szarkóma (*rat sarcoma*) sejtekből izolálták; három tagja a családnak az N-, Ha- és a Ki-RAS, amelyek a p21^{ras} nevű fehérjét kódolják. Bármely RAS proto-onkogén adott nukleotidjának pontmutációjával a fehérje eredeti GTPáz aktivitása erősen csökken, így annak GTP-kötött, a mitogén stimulus jelátvitelében szerepet játszó aktív formája stabilizálódik (Bos, 1997; Adjei, 2001, Riely és mtsai, 2009).

A daganatképződés hátterében nagyon sokszor kromoszómális transzlokációk állnak. Ezen folyamatok eredményeként adott gének, vagy génrészeket új környezetben más szabályozási folyamatok alá kerülnek, emiatt nem a megfelelő mértékben és/vagy nem a megfelelő szövetben kifejeződve tumoros elváltozások kialakulásához vezethetnek. A kromoszóma-transzlokációk eklatáns példája a krónikus mieloid leukémiákban gyakran megfigyelhető ún. Philadelphi-

kromoszóma, amelyet már a rákkutatás korai szakaszában, citogenetikai módszerekkel is ki tudtak mutatni (Nowell és Hungerford, 1960). A t(9;22)(q34;q11) reciprok transzlokáció során az ABL proto-onkogén átkerül a 9. kromoszómáról a 22. kromoszóma BCR (*breakpoint cluster region*) részére, amelynek eredménye a megrövidült 22. kromoszóma (Philadelphia-kromoszóma), molekuláris szinten pedig a BCR-ABL kiméra gén (Wong és Witte, 2001). Ez utóbbi terméke az ABL-nek köszönhetően egy tirozin-kináz fehérje, amely mai tudásunk szerint több szignál-transzdukciós útvonal serkentésében képes résztvenni, és ezzel felgyorsítani a sejtprolifерációt. A reciprok transzlokáció következményeként létrejött BCR-ABL fúziós gén egy olyan fúziós proteint kódol, amely aberráns tirozin kináz aktivitással rendelkezve kiindulópont nagyon sok jelátviteli út túlszabályozásában és a leukémiák kifejlődésében (Thijssen és mtsai, 1999; Laurent és mtsai, 2001; Hazlehurst és mtsai, 2009).

Aktiválási lehetőséget jelent az is, amikor onkogén nélküli retrovírus integrálódik a gazdasejt genomjában elhelyezkedő proto-onkogén – például a MYC – mellé, és a vírus LTR (*long terminal repeat*) szekvenciái aktiválják a gén működését. Ezen kívül számos olyan onkogén ismert, amelyek virális inszerció hatására is kifejtik tumorképző sajátosságukat, ilyenek például a MYB, a MOS, a Ha-RAS és a RAF gének (Lewin, 1994; Peter és mtsai, 2006).

Az onkogén aktiváció másik lehetősége az onkogén molekula adott részeinek elvesztése, azaz delécíója, mint például a MET onkogén esetében. Más esetekben az adott gén eredeti expressziós szintjének növekedése mögött – például a NEU (ERBB2) proto-onkogén esetében – a gén kópiaszámának növekedése áll. A gén terméke egy epidermális növekedési faktor receptor-szerű (EGFR) fehérje, amelynek az így megnövekedett szintje adott szignálutak állandó stimulálásával hozzájárulhat a sejtprolifерáció felgyorsításához, mint ahogy azt emlő-, petefészek- és gyomorrákok esetében megfigyelték (Tzahar és Yarden, 1998).

Az adott gén szabályozó régióját, vagy az ahhoz kapcsolódó transzkripciós faktorokat érintő mutációk is állhatnak a géntermék megnövekedett mennyiségének hátterében. A SIS proto-onkogén megemelkedett expressziós szintje például bizonyítottan ilyen jellegű folyamat, és nem pedig a DNS régió amplifikációjának következménye. A gén által kódolt fehérje ebben az esetben a vérlemezkéből

származó növekedési faktor, PDGF β -alegysége, amely nagyobb mennyiségben szintén szignálfolyamatok nem kívánt beindításával és/vagy folyamatos stimulációjával járulhat hozzá a malignus transzformációhoz, amint azt például asztrocitómákban és oszteoszarkómákban megfigyelték (Heldin és Westermark, 1999).

A proto-onkogéneket általánosságban a fehérjetermékük funkciói alapján csoportosítják, amely tulajdonképpen a normál sejtben zajló jelátviteli útvonalak különböző lépcsőfokait képviselő fehérjék csoportjait jelentik. Ezek alapján a szakirodalom a proto-onkogének öt nagy csoportját különíti el: 1) növekedési faktorok, 2) növekedési faktor receptorok, 3) citoplazmatikus protein-kinázok, 4) GTP-kötő fehérjék és a 5) transzkripció faktor eredetű fehérjék (Peters és Vousden, 1997). A főbb csoportokba tartozó génekre, illetve az onkogénné válásuk hátterében meghúzódó folyamatokra mutat be néhány példát a ***1. táblázat***.

1. táblázat: Onkogének és aktiválódási mechanizmusuk humán daganatokban (példák)

Név	Kromoszómális lokalizáció	Funkció	Aktiválás	Daganattípus
I. Növekedési faktorok				
SIS	22q13.1	növekedési faktor (PDGF) β -lánc	Fokozott expresszió	Szarkómák, asztrocitómák
II. Növekedési faktor receptorok				
SRC	20q12-13	membránkötött nem receptor jellegű tirozin-kináz	Pontmutáció	Szarkómák
ABL	9q34.1	nem-receptor protein tirozin kináz	Kromoszóma transzlokáció	CML, egyéb leukémiák
NEU (ERBB2)	17q11.2-12	csonkolt EGF-receptor, protein tirozin kináz	Génamplifikáció	Gyomorrák, emlő- és petefészekrák
III. G-proteinek				
RAS (Ki- Ha-N-)	12p12.1, 11p11.5, 1p13.2	membránkötött GTP-áz	Pontmutáció	Szarkómák, leukémiák
IV. Citoplazmatikus protein kinázok				
MOS	8q11	szerin/ treonin kináz	Pontmutáció	Endometriális karcinómák, petefészekrák
V. Nukleáris transzkripciós faktorok				
MYC	8q24.12-13	szekvenca-specifikus DNS-kötő protein, transzkripciós faktor	Kromoszóma transzlokáció, génamplifikáció	Burkitt-limfóma, szarkómák, karcinómák, leukémiák
FOS	14q24.3	AP-1 transzkripciós faktor része, DNS kötő protein	Génamplifikáció	Csontszarkómák
JUN	1p31-32	AP-1 transzkripciós faktor része, DNS kötő protein	Génamplifikáció	Fibroszarkómák
VI. Egyéb				
BCL-2	18q21.3	tirozin-kináz	Kromoszóma transzlokáció	Follikuláris B-sejtes limfóma

p: kromoszóma rövid kar, q: kromoszóma hosszú kar

1.3 A tumorsuppresszor gének szerepe a daganatok kialakulásában

A rákos fenotípus kialakításában szerepet játszó gének másik nagy csoportját a tumorsuppresszor gének alkotják, amelyek normális működésük esetén gátolják a szabályozatlan sejtprolifерációt, vagy megakadályozzák a sejtek örökítőanyagában bekövetkező károsodások felhalmozódását.

A daganatos megbetegedések családi halmozódású és sporadikus formáinak vizsgálata alapján állította fel Knudson az ún. „kettős találat” elméletét, amely szerint a tumorsuppresszor gének esetében két károsodás szükséges a daganatképződés megindításához, és ezek a kérdéses gén két allélját – recesszív génhatásként – érintik (Knudson, 1971). A retinoblasztóma családi halmozódású és sporadikus formáit (még a betegség kialakításáért felelős gén ismeretének hiányában) statisztikai módszerekkel is megvizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy a daganat kialakulásakor egy, akkor még feltételezetten tumorsuppresszor gén mindkét allélján mutáció alakult ki. A családi halmozódású esetekben az egyik allél már öröklötten károsodott, ez az adott daganatos megbetegedésre prediszponáló, azaz a rákhajlamot – de nem magát a betegséget – örökítő tényező. Következésképpen, familiáris esetekben a gén teljes inaktiválódásához „egy találat”, a vad típusú allél valamilyen módon történő szomatikus inaktivációja is elegendő, amely így a betegség korábbi életkorban való manifesztálódását jelenti. A sporadikus esetekben, ha öröklötten mindkét allél vad típusú, akkor két szomatikus mutációra van szükség a génműködés inaktivációjához, amely statisztikailag hosszabb idő alatt lejátszódó folyamatként az örökletes daganatokhoz képest későbbi életkorban való kifejlődéséhez vezet. További kutatások során sikerült az RB1 gént klónozni, elhelyezkedését Knudson munkacsoportja is már a 13. humán kromoszómára jósolta, majd egyre több tumorsuppresszor gént azonosítottak és többféle szempont alapján kategorizálták is azokat (Macleod, 2000).

A ma legelfogadottabb csoportosítás szerint a tumorsuppresszor géneket három nagyobb csoportba sorolják: megkülönböztetünk elsődleges (*gatekeeper*), másodlagos (*caretaker*) és harmadlagos (*landscaper*) tumorsuppresszorokat (Kinzler és Vogelstein, 1997; Kinzler és Vogelstein, 1998).

Az elsődleges tumorsuppresszorok a gének azon csoportját alkotják, amelyek direkt módon a sejtnövekedés antagonistái, így működésük hiánya egyértelműen meghatározó lépés a nem szabályozott sejtproliferáció beindulásában. Ennek a csoportnak a legismertebb tagja kétségkívül a már említett RB1 gén, amely a sejtciklus G1 fázisának végén, az ún. R-ponton (restrikciós pont) való áthaladást, és ezáltal az S-fázisba való belépést szabályozza. A gén fehérjeterméke hipofoszforilált állapotban köti a DP-1/E2F heterodimer transzkripciós faktort, és így gátolja az S-fázishoz szükséges gének átíródását. Az R-pont közelében azonban ciklinfüggő kinázok (emlősökben a CDK4 és CDK6 fehérjék D-típusú ciklinekkel kapcsolódva) az rb1 fehérjét foszforilálják, amely ebben a formában már nem tudja gátolni az említett transzkripciós faktorokat, és a sejt így beléphet a sejtciklus S-fázisába. A gén csíravonales mutációi elsősorban a fiatalkori retinoblasztóma kialakulására hajlamosítanak, a gén szomatikus mutációit azonban más típusú daganatokban, így csontszarkómákban, az agyalapi mirigyből kiinduló adenokarcinómákban és feokromocitómákban is kimutatták (Friend és mtsai, 1986; Friend és mtsai, 1987; Horowitz és mtsai, 1990; La Thangue, 1997; Mastrangelo és mtsai, 2008).

A másodlagos tumorsuppresszorokhoz olyan gének tartoznak, amelyek a DNS-t ért károsodások kijavításával és a genom stabilitásának megőrzésével indirekt módon szabályozzák a sejtnövekedést, mivel működésükkel gátolják más proto-onkogénekben és tumorsuppresszor génekben mutációk kialakulását. Ide tartoznak például az ún. *mismatch repair* géncsalád tagjai, mint az MLH1 és az MSH2. Ezek a gének sorrendben a bakteriális mutL és mutS gének homológjai, és termékeik más fehérjékkel (többek között az msh6, pms1 és pms2 gének termékeivel) komplexet alkotva a replikációt során felhalmozódott hibákat hivatottak kijavítani. Ezen gének működésének a hiánya az ún. mikroszatellita instabilitás fenotípushoz, és ezzel együtt az egyéb génekben megjelenő mutációkhoz kapcsoltan malignus transzformációhoz vezet. A gének csíravonales és szomatikus mutációit elsősorban a kolorektális daganatok egy csoportjában, az ún. HNPCC (örökletes nem polipózisos kolorektális daganat) szindrómában mutatták ki (Parsons, 1997; Black, 1997; Cropley és mtsai, 2008).

Az elsődleges és másodlagos tumorsuppresszor gének tárgyalásakor mindenképpen meg kell említeni a TP53 gént, amelynek a szerepe némileg egyedülálló, hiszen mind a két géncsoportba besorolható. Mivel a gén meghibásodásait az emberi daganatok megközelítőleg 70%-ban ki tudták mutatni, ezért úgy gondolták, hogy az RB1 génhez hasonlóan a TP53-nak is központi szerepe van a sejtsztódási folyamatok szabályozásában. Később kiderült, hogy a fehérje egyfajta szenzorként működik: ha a DNS állományt károsodások érik, akkor a sejtet nem engedi áthaladni a G1/S fázishatáron. Ha pedig ezen károsodások mértéke meghalad egy bizonyos szintet, akkor a TP53 gén terméke, mint transzkripciós faktor, olyan gének átíródását indítja be, amelyek apoptózishoz vezetnek, és elpusztítják a sejtet. Mindezen megfontolások alapján érthető, hogy a gén valamilyen módon mindkét tumorsuppresszor kategóriába beleillik (Lane, 1992; Almog és Rotter, 1997; Gangopadhyay és mtsai, 1997; Zenz és mtsai, 2009).

A harmadlagos tumorsuppresszor gének csoportjába viszonylag kevés gén tartozik. Kinzler és Vogelstein ezt a csoportot a juvenilis polipózis szindróma (JPS) kapcsán tapasztalt jelenségekre alapozva alkotta meg (Kinzler és Vogelstein, 1998). Megfigyelték ugyanis, hogy bizonyos gének mutációit hordozó egyénekben a másik allélt érintő szomatikus inaktiváció a tumorban nem, csak a környező szövetekben figyelhető meg. Azt a hipotézist állították fel, hogy ezen gének működésének hiánya olyan mikrokörnyezetet képes kialakítani, amely a daganatsejtek proliferációja szempontjából kedvező, és ilyen módon segítik elő a malignus transzformációt. Jellemző példa a DPC4 gén, amelynek mutációi vastagbél-daganatokra jellemzőek, illetve vannak olyan elképzelések, miszerint bizonyos esetekben a PTEN gén is hasonlóképpen járulhat hozzá a daganat manifesztációjához a Cowden-betegség és a JPS esetén is (Lynch és mtsai, 1997; Howe és mtsai, 1998; Olschwang és mtsai, 1998; Morgan és mtsai, 2009).

A molekuláris genetika fejlődése, az újabb és újabb tumorsuppresszor gének megismerése egyre tovább finomítja a Knudson által megfogalmazott „kettős találat” elméletet (Knudson, 1996; Knudson, 2001). Ezen vizsgálatok szerint a két allélt érintő károsodás az eddig megismert szomatikus mutáció vagy az allélvesztés jelensége (*loss of heterozygosity*, LOH) mellett epigenetikai folyamatok kapcsán is végbemehet. Sok esetben írtak le ugyanis egy adott gén promóter régióját érintő

metiláción és hiszton deacetiláción keresztül bekövetkező allél-inaktiválódást, amely folyamatok ennek megfelelően szélesítik a Knudson-féle inaktivációs mechanizmusok tárházát (Mielnicki és mtsai, 2001).

Nagyobb kihívást jelentenek azonban az elmélet számára azok az eredmények, amelyek arról számolnak be, hogy több tumorsuppresszor gén esetén elég az egyik allélnak inaktiválódnia ahhoz, hogy a gén működése zavart szenvedjen. Jó példák erre többek között a TP53 gén olyan mutációi, amelyek domináns-negatív fenotípust mutatnak. Ezekben az esetekben ugyanis egy mutáns fehérjetermék a belőle és a hibátlan allél termékéből felépülő, oligomerként működő fehérjekomplexet képes teljesen tönkretenni (Kemp és mtsai, 1993; Venkatachalam és mtsai, 1998). Más tumorsuppresszorok, így például a CDKN1B vagy a DMP1 esetében kiderült, hogy ezek a gének a haploid elégtelenség (haploid inszufficiencia) jelenségét mutatják, így egy jó allél jelenléte nem elegendő a teljes tumorsuppresszor funkció betöltéséhez (Fero és mtsai, 1998; Inoue és mtsai, 2001). Mindezen eredményeket a jövőben a tudományos kutatás mellett a molekuláris diagnosztikában is figyelembe kell venni. A **2. táblázat** az eddig megismert tumorsuppresszor génekre mutat be néhány példát.

2. táblázat: Tumorsuppresszor gének humán daganatokban (példák a Kinzler-Vogelstein csoportosítás alapján)

Név	Kromoszómális lokalizáció	Géntermék celluláris előfordulása/funkciója	Daganattípus
I. Elsődleges (<i>gatekeeper</i>) tumorsuppresszor gének			
RB1	13q14	Sejtmag/sejtciklus G1/S átmenetének transzkripcionális szabályozása	Retinoblasztóma, Csontszarkóma
VHL	3p25-26	Citoplazma, Sejtmag/transzkripció faktor kötés	Vesedaganatok, kisagyi hemangióma
NF1	17q11	Citoplazma/GTP-áz aktivátor	Neurofibromatózis, szarkómák, gliómák
APC	5q21	Citoplazma/sejtmigráció, kromoszóma szétválás, β -katenin kötés	Vastagbél-, végbélrák
II. Másodlagos (<i>caretaker</i>) tumorsuppresszor gének			
TP53	17p13	Sejtmag/transzkripció faktor	Li-Fraumeni szindróma, szarkómák, emlőrák
BRCA1	17q21	Sejtmag/DNS hibajavítás, transzkripció szabályozás	Emlő- és petefészekrák
BRCA2	13q12	Sejtmag/DNS hibajavítás, transzkripció szabályozás	Emlő- és egyéb daganatok
MSH2	2p22	Sejtmag/DNS (<i>mismatch</i>) hibajavítás	Vastagbél-, végbélrák; endometriális karcinóma
MLH1	3p21	Sejtmag/DNS (<i>mismatch</i>) hibajavítás	Vastagbél-, végbélrák; endometriális karcinóma
III. Harmadlagos (<i>landscaper</i>) tumorsuppresszor gének			
PMS1	2q31	Sejtmag/DNS (<i>mismatch</i>) hibajavítás	Vastagbél-, végbélrák
PTEN	10q23.3	Citoplazma/lipid foszfatáz	Cowden szindróma, prosztata-daganat, emlőrák

p: kromoszóma rövid kar, q: kromoszóma hosszú kar

1.4 Kemoterápiás és genomikai megközelítések

A rosszindulatú daganatok kialakulása hosszú, éveket-évtizedeket igénylő folyamat, amelynek molekuláris mechanizmusáról az elmúlt évtizedek kutatómunkájának köszönhetően egyre részletesebb kép rajzolódik ki előttünk. Mai tudásunk szerint a klinikailag is manifesztálódó tumorok kialakulásának, azaz a kezdetben egészséges testi sejtek rosszindulatú elfajulásának (malignus transzformációjának), majd az elfajult klónok fokozatos önállósodásának, és további daganatos progressziójának két fő hajtóereje van (Bertram, 2000). Az egyik a testi sejtekben kialakuló károsító, véletlenszerű mutációk genom-romboló hatása, azaz a genomi instabilitás kialakítása, amellyel a rákos sejtek között is állandóan újabb és újabb mutáns változatok jönnek létre. A másik fő szelekciós tényező pedig egyfajta folyamatos evolúciós hagyatékként az a klonális szelekció, ami az egymással versengő tumorsejtváltozatok közül fokozatosan kiválogatja a legrátermettebbeket. Ennek a felfogásnak az az egyik fő következtetése, hogy a szervezetben nap mint nap kialakuló prekancerózus – azaz a transzformáció útján éppen csak megindult – sejtek közül egy emberélet alatt csak egy elenyészően kis hányad jut el arra a fokra, hogy már klinikailag is megjelenő tumorokat hozzon létre. A teória másik fő üzenete azonban az, hogy az ilyen tumorokban megtalálható sejtek már egy igen hosszú evolúciós utat bejárt, az őket körülvevő környezethez és annak védelmi reakcióihoz nagy mértékben alkalmazkodott csoportot képeznek, a tumoros mikroevolúció egyfajta csúcának tekinthetők. Mindebből következik, hogy a daganatos progresszió során a fejlődő tumor fokozatosan szerzi meg azt az önállóságot és autonómiát, ami a már terápiás beavatkozást is igénylő, a klinikumban rendszerint ellátott, diagnosztizálható daganatok sajátja.

A gyakorlati terápiás megközelítések alkalmazásánál is tekintetbe kell venni a neoplasztikus autonómia megszerzésének folyamatát, azaz a szervezetszintű szabályozórendszerek parancsaitól független túlélést és növekedést (szabályozatlan proliferáció), a normális szövethatároktól való függetlenség elnyerését és a környező egészséges szövetbe való behatolást (invazivitás), a növekvő daganat keringésének önálló megszervezését (angiogenezis), a lokális immunválaszok eltérítésére, elnyomására, illetve a tumor érdekeit szolgáló manipulációjára való képesség

megszerzését (immunmoduláció), és végül, a keringésbe való betörés, az abban való túlélés, és távoli szervek, szövetek kolonizálásának (metasztázis-képzés) képességét (Bronchud, 2000). A daganatos megbetegedések kezelésének három fő pillére évtizedek óta a sebészet, a sugár- és a gyógyszeres terápia. Az utóbbi évtizedekre jellemző:

1. a sebészeti beavatkozások kapcsán a módszerek továbbfejlesztése és finomítása az invazivitás drasztikusságának a lehető legnagyobb mértékű csökkentésével;

2. a sugárterápiás megközelítések kiterjesztése a jól lokalizálható tumorokra;

3. a gyógyszeres kezelések alkalmazása biokémiai támadáspontok ellen, benne a purin- és pirimidin bioszintézis blokkolókkal, a daganatsejtek szaporodását gátló szerek alkalmazásával a gyakorlatban.

A molekuláris célterápiák – amelyek első hatóanyagait az elmúlt évtizedekben ismertük meg – a személyre szabott kezeléseket és a gyógyítást hivatottak segíteni. Erre a molekuláris onkogenetikai/genomika utóbbi két évtizedes robbanásszerű fejlődése biztosított alapot (Oláh, 2004, 2007; Oyan és mtsai, 2007; van't Veer, 2008).

A daganatsejtek anyagcsere-folyamatait régóta tanulmányozzák abban a reményben, hogy a nem-daganatos sejtek anyagcseréjével szemben valamilyen jellegzetes különbséget találnak, amely biokémiai támadáspontot biztosít a daganatok gyógyszeres kezelésében.

Alapvető tézisként tekinthetők a daganatkutatás területén Weber és munkatársai által tett megállapítások, miszerint a malignus fenotípus komplexitásának hátterében az enzimatis és a metabolikus folyamatok egyensúlyának felbomlása tapasztalható (Weber, 1983). Javaslati alapján a kulcsfontosságú enzimek valamint a metabolikus útvonalak változásainak tanulmányozásán, és a daganatsejtek genomjában kódolt, normál sejtektől eltérő génexpressziós profil azonosításán keresztül könnyebben megérthetjük a ráksejtek létezését, könnyebben kialakíthatjuk az esetleges támadáspontokat is (Bullinger és Valk, 2005; Song és mtsai, 2006; Willman, 2008). A felgyorsult sejtosztódás hátterében mindig megfigyelhető a szintetikus guanilát anyagcsere extrém aktiválódása. Az IMP dehidrogenáz (IMPDH; EC 1.1.1.205), a GTP bioszintézis

kulcsenzime, fontos daganatterápiás célpont (Jackson és Weber, 1976). Ezt a tényt bizonyítja az a felfedezés is, miszerint BCR-ABL pozitív leukémiában az IMPDH támadásával, az intracelluláris GTP koncentráció csökkentésével a sejtszaporodás, a RAS és MYC onkogének gátlását követően a differenciáció serkentése érhető el (Oláh és mtsai 1988, 1989). Ezen eredmények új értelmet nyerhetnek annak a koncepciónak a fényében, miszerint az onkogén-indukált daganatképződés lehet reverzibilis folyamat, a malignus fenotípus visszaszorításához akár egyetlen onkogén (MYC, RAS, ABL) aktivációjának gátlása is elegendő lehet (Felsher és Bishop, 1999; Pelengaris és Khan, 2003; Jain és mtsai, 2002; Fisher és mtsai, 2001; Karlsson és mtsai, 2003; Gunther és mtsai, 2003; Felsher, 2004).

A következőkben két, biokémiaiilag már ismert támadásponttal rendelkező szer bemutatása következik, amelyek daganatellenes hatásának megerősítése és a mögöttes molekuláris változások feltárása új ismereteket ígér a daganatsejtek molekuláris célpontjainak megismerésében (Oláh, 1991).

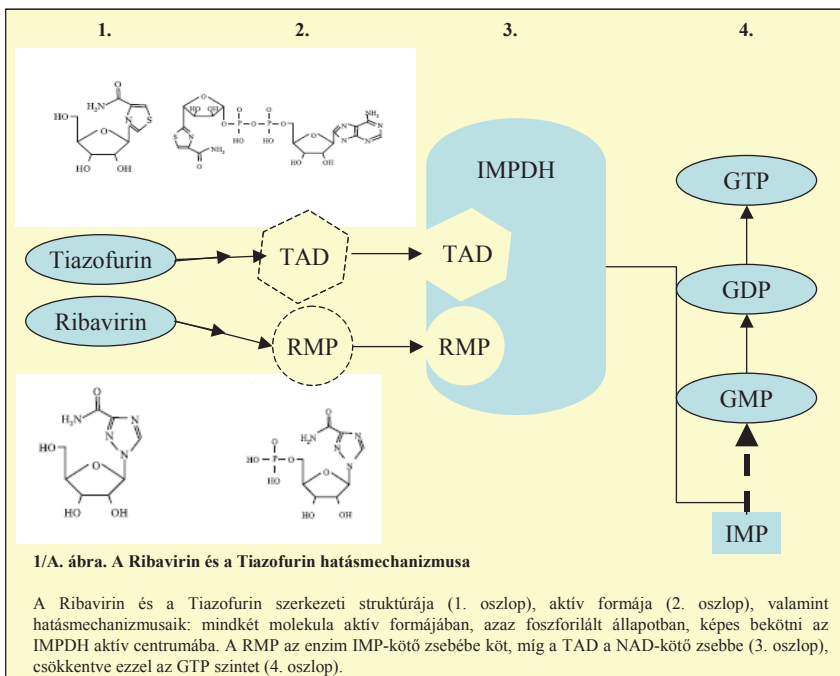
1.4.1 A Ribavirin

A Ribavirin (1- β -D-ribouranozil-1,2,4-triazol-3-karboxamid) egy szintetikus ribonukleozid analóg, amelyet 1970-ben fejlesztett ki az ICN Pharmaceuticals gyógyszergyár. A klinikumban általánosan használt vírusellenes szer DNS és RNS vírusfertőzések kezelésére. A Ribavirin (Virazol) gyógyszeres kezelés interferon- α -val való kombinálását legtöbbször a hepatitis B és C fertőzések esetén alkalmazzák (Sidwell és mtsai, 1972; Crotty és mtsai, 2000; Cotonat, 2000; Capanni és mtsai, 2008). Olyan mutációkat képes – többféle módon – generálni a virális genomban, amelynek következményeként hibás lesz a vírus genom replikációja és/vagy hibás vírusfehérje alakul ki (Crotty és mtsai, 2000; Cameron és Castro, 2001).

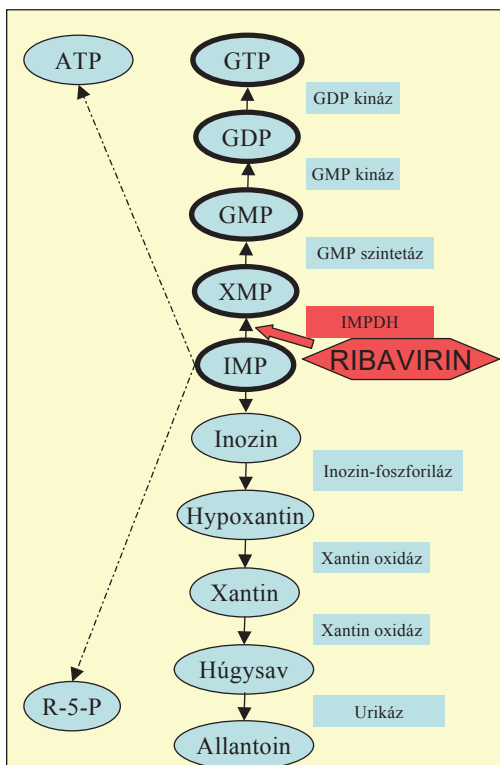
Emlős sejtekben való felhalmozódásának köszönhetően az aktív forma (RMP, Ribavirin-5-monofoszfát) specifikus, kompetitív inhibitora az inozitol-5'-monofoszfát-dehidrogenáznak (IMPDH), amely alapvető szerepet játszik a sejten lejátszódó *de novo* GTP szintézisben. Az IMPDH gátlásán és a GTP szint csökkentésén keresztül a Ribavirin hatással van számos sejtleptani folyamatra. A protein szintézis tekintetében a csökkentett GTP mennyiség miatt csökken a rövid

fél-életidejű enzimek (PI4-kináz, PIP5-kináz és a PLC) aktivitása amely végeredményben zavart jelátvitelhez is vezet. Kimutatták, hogy a Ribavirin és quercetin – egy növényi, anti-karcinogén hatású flavonoid – együttes alkalmazásával jelentősen csökkent a sejtekben az IP₃ szint és a myeloma valamint petefészekdaganat sejtek a differenciáció vagy az apoptózis irányba köteleződtek el (Li és mtsai, 1999).

Egyértelmű bizonyítást nyert az is, hogy a Ribavirin és a Tiazofurin kombinált kezelés citotoxikus hatású patkány hepatóma sejtekben (Natsumeda és mtsai, 1988). Mindkét szer célpontja az IMPDH, viszont míg a Tiazofurin aktív formája egy NAD analóggént fejt ki hatását, addig az RMP az enzim természetes ligandumainál nagyobb affinitással köt be az IMP-XMP ligandum-kötő zsebbe (Yamada és mtsai, 1988). Kiderült az is, hogy együttes alkalmazás során az előzetes Tiazofurin kezelés által kialakított alacsony IMPDH aktivitást a Ribavirin képes ugyanolyan értéken tartani a csontvelőben (Prajda és mtsai, 1993). A két molekula hatásmechanizmusát mutatja be az 1/A. ábra.



1998-ban Ilyin és munkatársai közölték azon megfigyeléseiket, miszerint a HCV fertőzött és Ribavirinrel kezelt betegek esetén a májsejtekre ható toxicitásban a Ribavirin bizonyítottan alapvető szerephez jut a GTP szint csökkentésén keresztül a nukleo-citoplazmatikus szállítási folyamatokban, a citoszeletális mikrotubulus dinamikában, a hő-sokk rezisztenciában valamint a Ras-Raf-1 útvonal gátlásában és a szenzitív sejtekben a sejtciklus G1 fázisban való feltartóztatásában is. Ezen páciensek vérében talált 50 μM Ribavirin koncentráció alkalmasnak bizonyult a májsejtekben a DNS szintézis gátlására és ezzel a vírus-kópiaszámának csökkentésére (Ilyin és mtsai, 1998). A Ribavirin támadáspontját és biokémiai útvonalakban elfoglalt helyét mutatja be az **1/B. ábra**.



1/B. ábra. A Ribavirin biokémiai támadáspontja

A Ribavirin az IMP-ből kiinduló GTP szintézis központi enzimének, az IMPDH-nak a gátlásával csökkenti a sejtben levő GTP szintet. Az IMP-ből további útvonalakon ATP, ribózfoszfát-pirofoszfát (R-5-P) és a húgysav oxidálását követően allantoin képződik (módosítva Weber és mtsai, 2003. alapján).

Vallée valamint Weber laboratóriumában született eredmények szerint a GTP koncentrációhoz kapcsolható p21^{ras} protein szint is szignifikánsan csökkent a Ribavirin kezelés hatásának köszönhetően IGR39 humán melanóma sejtekben, és ennek egyenes következménye a jelátviteli folyamatok gátlása. A lecsökkent MAPK/ERK szint közvetlen kapcsolatban lehet a hő-sokk fehérjék kifejeződésével és a Raf kináz expressziós szabályozásának változásával Ribavirin kezelt sejtekben (Vallée és mtsai, 2000; Weber és mtsai, 2003). Későbbiekben bizonyították azt is, hogy a Ribavirinnek immunmoduláló hatása van abban az értelemben, hogy az immunválaszt a T-helper 2 sejtek felől a T-helper 1 sejtek által közvetített immunválasz felé tolja el. A konkrét hatásmechanizmus még nem ismert, azonban biztonságos és alkalmas adjuvánsként alkalmazható immunterápia esetén. Hatásos lehet olyan betegségekben (pl. multiplex myeloma) is, amelyekre jellemző, hogy a sejtekben nitrogén-monoxid szabadul fel, és ezen esetekben az IFN mellett kiegészítő kemoterápiás szerként is alkalmazható, mivel a Ribavirin elősegíti a nitrogén-monoxid felszabadulását (Kast, 2002).

Perifériás vérsejtek Ribavirin és Ribavirin-IFN kombinációs kezelését követően, 22000 gén expresszió szintjét egyszerre detektáló *microarray* módszerrel kimutatták, hogy a Ribavirin egyedüli kezelésének nincs hatása a gének expressziójára normál sejtekben. A kombinációs kezelést követően azonban az apoptózisban, a stresszválaszban, a fehérjeszintézisben és egyéb szignalizációs folyamatokban szereplő gének kifejeződése változott meg (Taylor és mtsai, 2004).

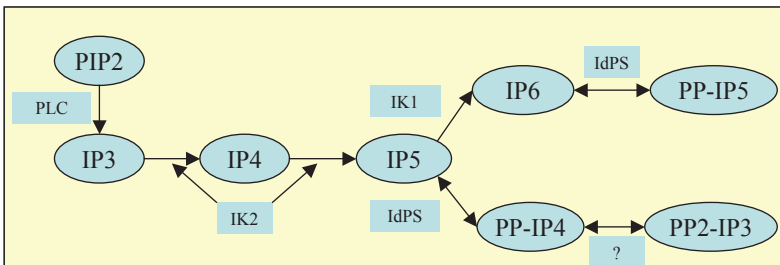
A legújabb eredmények alapján a Ribavirin transzkripció és transláció gátlásával is kifejezheti hatását, hiszen képes beépülni az mRNS-ek 5' végén a 7-metil-guanozin sapka kötő helyére, a GTP helyett. Ezzel megakadályozza az eukarióta translációs iniciációs faktor (eIF4E) bekötődését és az mRNS-ről a fehérjéképződést is, csakúgy mint például a ciklin D1 és a VEGF gének expresszióját egér és emberi eIF4E-függő leukémiás sejtekben (Kentsis és mtsai, 2004, 2005; Culjkovic és mtsai, 2008).

A Ribavirin ma még felderítetlen molekuláris és sejszintű hatásainak a feltárása jelentős lehet a daganatsejtekben kialakított változások megértésében, illetőleg a Ribavirin esetleges rákellenes szerként való bevezetésében.

1.4.2 Az IP6

Az inozitol-hexakiszfoszfát (IP6), egy a természetben előforduló polifoszforilált szénhidrát molekula, amely nagy koncentrációban megtalálható növényi magvakban és szövetekben (Harland és Oberleas, 1987). Az emlősök táplálkozással vehetik fel az exogén IP6-ot, azonban sok esetben a sejt maga is képes előállítani inozitol-polifoszfátokból az anyagszere folyamán (Hanakahi és mtsai, 2000). Szerepét számos sejtelettani folyamatban említi az irodalom, ilyenek például a gyulladásos folyamatok, az mRNS szállítása a sejtmagból, fehérjekötés és konformációjuk megváltoztatása, sőt DNS javítási (NHEJ-DSR) folyamatban is (Shamsuddin és Vucenik, 1999; Hanakahi és mtsai, 2000; Shears, 2001).

Az IP6 daganatellenes hatását már több ráktípus esetében igazolták, úgymint a vastagbél-, prosztatá-, tüdő-, máj-, hasnyálmirigy- és emlőrák. Kutatások bizonyították, hogy az IP6 hatása és a ráksejt anyagszerében betöltött szerepe a daganatsejtek típusa és szöveti eredete szerint is változik, és nemcsak citosztatikus, hanem citotoxikus is malignus sejtekben (Sakamoto és mtsai, 1993; Shamsuddin és Yang, 1995; Shamsuddin és mtsai, 1996; Wattenberg, 1999; Shamsuddin és Vucenik, 1999; Vucenik és mtsai, 1998; Somasundar és mtsai, 2005; Karmakar és mtsai, 2007). Állatmodellekben IP6 kezelést követően a megjelent tumorok számának és méretének csökkenését tapasztalták (Vucenik és Shamsuddin, 1994). Az IP6 a sejtfelületen található receptoron megkötődik és ekkor a foszfolipáz-C bontja a foszfátidil-inozitol-2-foszfátot (PIP2) inozitol-3-foszfátra (IP3) és diacilglicerinné (DAG), majd ezen másodlagos hírvivők segítségével képes közvetve befolyásolni a gének kifejeződését (Shears, 2001). Az IP6 daganatellenes hatásának a sejtciklusban megnyilvánuló formája pedig a sejtek G0/G1 fázisban történő feltartóztatása (El-Sherbiny és mtsai, 2001). Az inozitol-polifoszfátok metabolizmusát mutatja be a **2. ábra**.



2. ábra. Inozitol-polifoszfátok metabolizmusa

A foszfolipáz-C (PLC) hidrolizálja a PIP2-t a sejtmembránhoz kötött komplexben, majd a felszabadult IP3 az inozitol-kináz 2 (IK2) enzim segítségével egy polifoszforilációs folyamaton keresztül IP5 molekulává alakul. Az IP5-t az inozitol-kináz 1 (IK1) enzim foszforilálja IP6-tá, majd az inozitol-difoszforil-szintáz (IdPS) PP-IP5 molekulává, vagy az IP5-öt PP-IP4 molekulává. A PP-IP4-et még nem ismert enzim alakítja PP2-IP3 molekulává. Az IP6 felépítési és lebomlási folyamatainak egyensúlya és szabályozása alapvető a daganatsejtek proliferációjának gátlása tekintetében (módosítva York és mtsai, 2004. alapján).

Az IP6 által közvetített hatásmechanizmusok között a strukturális gátlás, az angiogenezis gátlása, sejtmotilitás és sejtkapcsolatok számának csökkentése, az NK és neutrofil granulocita sejtek serkentése valamint antioxidánsként való alkalmazása is elterjedt (Baten és mtsai, 1989; Phillippy és Graf, 1996; Tantivejkul és mtsai, 2003; Vucenik és mtsai, 2004). Széleskörű vizsgálatok eredményeképpen kiderült, hogy az IP6 serkenti a p21^{WAF-1/CIP1} gén expresszióját, ezen keresztül pedig hat a p53 által közvetített sejtproliferáció gátlásra is (Saied és Shamsuddin, 1998). Az IP6 és defoszforilált származékai – IP4 és IP5 – is serkentik a differenciációs folyamatokat daganatsejtekben és a megbomlott szaporodási egyensúly visszaállítására is alkalmasak (Shamsuddin és mtsai, 1992; De Camilli és mtsai, 1996). Prostatatárak IP6-tal történt kezelését követően erősödött a ciklin-függő kináz inhibitorok (Kip1/p27 és Cip1/p21) kötődése a ciklin-függő kinázokhoz (ciklin D1 és E) valamint az RB fehérje hipofoszforilálódása mellett az E2F transzlációs iniciációs faktor gátlását tapasztalták. Ezen hatások mellett az apoptotikus markergének, mint például a kaszpáz-3 aktiválódása is kimutatható volt a daganat gátlásának folyamatában (Singh és mtsai, 2003; Roy és mtsai, 2009). A legújabb eredmények alapján az IP6 inaktíválja az emberi és egér prostatatárak sejtekben aberránsan aktiválódott telomeráz-reverz-transzkriptáz (TERT) gént, elősegíti a TERT

sejtmagból történő transzportját valamint az AKT és PKC gének gátlását is (Jagadeesh és Banerjee, 2006).

Leukémia sejtek IP6 kezeléséből származó adatok alapján bizonyított tény, hogy a sejtszaporodás gátlása kiterjeszthető emberi leukémiás haematopoetikus vonalakra – mint a K562 sejtvonal is – és ezek a hatások idő- és dózisfüggést mutattak. Deliliers és munkatársai K562 sejteket kezeltek IP6-tal (5 mM), majd 1176 emberi cDNS-t tartalmazó *microarray* vizsgálat eredményei alapján az aktivált proto-onkogének kifejeződésének csökkenését, az apoptotikus és differenciációs gének expressziójának emelkedését tapasztalták (Deliliers és mtsai, 2002).

Az IP6-tal végzett kísérleteink végső céljaként tekintettük a korábbi megfigyeléseken alapuló, azokból kirajzolódó változások teljes transzkriptomikai szintre való kiterjesztését, illetve a későbbiek során ezekre alapozva molekuláris támadási célpontok kijelölését is.

2 CÉLKITŰZÉSEK

Az Országos Onkológiai Intézet Molekuláris Genetikai Osztálya a nemzetközi viszonylatban is csak kialakulófélben levő molekuláris onkogenetikai irányzatokhoz kapcsolódva, a 80-as évek közepétől Magyarországon elsőként vezette be a molekuláris onkogenetikai kutatásokat, amelynek célja a daganatok háttérében álló génváltozások kimutatása, a „rákgének” malignus transzformációban betöltött szerepének tisztázása valamint ezen ismereteink lehetséges alkalmazása a daganatterápia területén (Oláh és mtsai, 1988; Oláh, 1991). Erre alapozva kezdte el a munkacsoport a potenciális daganatellenes szerek ráksejteken való tesztelését, gének kifejeződésének vizsgálatát, expressziós mintázatok, lehetséges támadási célpontok vagy potenciális biomarkerek feltérképezését. Ebben a munkában bekapcsolódva kaptam meg kutatási témaként a Ribavirin és az IP6 molekuláris és sejtleletani hatásának vizsgálatát leukémia modellként általánosan használt K562 sejtekben, különös tekintettel a daganatsejtek szaporodásának gátlásával kapcsolatos génextpressziós változások kutatására.

A daganatterápiás vizsgálataink egyik területe a természetben előforduló IP6 tanulmányozása annak felmérésére, hogy lehetséges-e daganatterápiás hatóanyagkénti alkalmazása leukémia sejteken. Az irodalomban már körvonalazódik az IP6 daganatellenes hatása (Vucenik és Shamsuddin, 2003). Munkánk során igyekeztünk minél pontosabb képet kapni arról, hogy az IP6 milyen hatással van leukémia sejtek transzkriptomjára. Végcélként tekintjük olyan biomarkerek és útvonalak azonosítását, amelyek működésének gátlása akár a gyógyászat területén is alkalmazást nyerhet, esetleg már használatos ágensek alkalmazásával, kombinálásával.

Az elmúlt évek molekuláris genetikai vizsgálatainak alapjául szolgált az a korábbi megfigyelés, amelyet munkacsoportunk ezen területen elsőként közölt, miszerint a Tiazofurin csökkenti a RAS/MYC onkogének kórosan megemelkedett expresszióját, és indukálja humán leukémia sejtek eritroid differenciálódását, gátolják a daganatsejtek szaporodását (Oláh és mtsai, 1988, 1989, 1990). Eredményeiket más kutatók is alátámasztották, sőt Tiazofurinnal kezelt leukémiás betegekben is megerősítették a MYC onkogén csökkent kifejeződését, a sejt differenciálódási folyamatok kiváltását és a malignus sejt szaporodás

visszaszorítását (Weber és mtsai, 1990). A Ribavirin egyedüli alkalmazásával egér nyelőcsődaganatok méretének drasztikus csökkenését is tapasztalták, amelynek háttérében nemcsak az IMPDH aktivitás csökkenése áll, hanem az, hogy a Ribavirin képes az mRNS 5'-végén levő metilcsoport tartalmú sapka helyére bekötve, az eIF4E translációs iniciációs faktorok gátlásával a fehérjeképződést is gátolni (Kentsis és mtsai, 2004). Ezen tények ismeretében felmerült a Ribavirin egyedüli hatásának feltérképezése rákos sejtek élettani és genetikai folyamatainak szabályozásában.

Mivel a mai napig nem vizsgálták részletesen daganatokban, főleg leukémia sejtekben ezen szerkezelések következményeit, a globális génexpressziós változásokat, valamint a hatásmechanizmusok háttérében álló jelátviteli útvonalakat, ezért kísérleteink tervezésekor a génexpressziós mintázat megértésére vonatkozólag a következő kérdéseket fogalmaztuk meg:

- ❶ Milyen módszerekkel lehet a leggyorsabban optimális és megbízható képet kapni a sejtvonalakban található mRNS szintű expressziós profilról? Vizsgálati módszereink optimalizálását követően felállítható-e egy sztenderd módszer későbbi kísérleteinkhez?
- ❷ Milyen sejtleletani változások tudhatók be az IP6 kezelés hatásának? Ezek háttérében kimutathatóak-e specifikus génexpressziós mintázatok, és adott géncsoportok kifejeződésének változásai leukémia sejtekben?
- ❸ Ribavirin egyedüli alkalmazása által kiváltott sejtleletani változások kimutathatóak-e daganatsejtenyészetekben? Lehet-e azonosítani olyan génexpressziós aláírásokat, markereket avagy útvonalakat, amelyek aktiválódása vagy gátlása a szerhatáshoz köthetőek, és a későbbiekben potenciális támadáspontok lehetnek leukémia sejtekben?
- ❹ A két szerhatás összehasonlításában mennyiben térnek el vagy azonosak a transzkripciós mintázatok? Ezek alapján azonosíthatóak-e azonos biomarkerek és útvonalak, amelyek akár a gyógyászat területén is alkalmazást nyerhetnek?

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Sejttenyészetek fenntartása

Vizsgálatainkhoz négy emberi tumorsejtvonalat használtunk, amelyeket 37°C-on, párasított légtérű inkubátorban tenyésztettünk. Az MCF-7 és a HepG2 tenyészetek D-MEM tápoldatban, míg az OVCAR-5 és a K562 sejtvonalak RPMI-1640 tápoldatban nőttek. A tenyészetek tápoldatához 10% borjúsavót adtunk, passzáláskor az eredeti szuszpenziót 1:4 arányban hígítottuk friss tápfolyadékkal. Az MCF-7 egy erősen metasztatizáló, ösztrogén receptor pozitív emlőtumorból, a HepG2 egy hepatocelluláris karcinómából, míg az OVCAR-5 egy ováriumkarcinómából származó sejtvonal.

Molekuláris genetikai vizsgálatainkat K562 humán sejtvonalon végeztük, amely egy 53 éves, krónikus mieloid leukémiában (CML) szenvedő, terminális blaszt krízis – akut, agresszív végstádium – állapotában levő női páciens véréből származik (Lozzio és Lozzio 1975). A sejteket differenciálatlan granulocita populációként azonosították, és fő karakterisztikus bélyegként Philadelphia-kromoszómát t(9;22)(q34;q11) tartalmaztak (Lozzio és Lozzio 1979). A K562 blaszt sejtek multipotenciális, haematopoetikus malignus sejtek, amelyek spontán differenciálódnak eritrocita, granulocita és monocita progenitorok jelenlétében. Manapság a sejtvonalat – nagyfokú érzékenysége, könnyű tenyésztethetősége és gyors növekedési képessége miatt – széles körben alkalmazzák in vitro kísérletekben.

3.2 A sejttenyészetek kezelése Ribavirinnel és IP6-tal

Vizsgálatainkhoz sejteket különböző – 1, 10, 20, 50, 100, 150 μM – koncentrációjú Ribavirin oldattal kezeltük. Az IP6-tal történő vizsgálatok esetén 0-0,5-1-2,5-5 és 10 mM IP6 oldattal kezeltük a sejteket. A szerhatás számszerűsítése érdekében, a túlélés meghatározására logaritmikus szaporodási fázisban növő tenyészet tápfolyadékához adtuk a tesztvegyület kis térfogatú szérummentes oldatát. A kezelt sejtek túlélési képességét tripánkéék vitális festés

segítségével határoztuk meg az élő sejtek megszámlálásával úgy, hogy a kezelés öt napja alatt, minden 24 órában mintát vettünk a tenyészetekből.

A lágyagar módszer esetén 5 ml RPMI 1640 oldatban lévő 1000 darab K562 sejtet Petri csészékbe szélesztettünk. A csészékben levő oldat 10, 30 és 50 μM végkoncentrációjú Ribavirint valamint 0,33% agart (Noble-agar; Difco Laboratories, USA) tartalmazott. A kezelést követő 14. napon a több mint 50 sejtet tartalmazó kolóniákat számoltuk meg mikroszkóp segítségével. Kontrollként kezeletlen sejteket alkalmaztunk és regressziós görbeillesztés módszerével határoztuk meg a sejtvonalakra jellemző IC_{50} értékeket mind a lágyagar, mind pedig a tápfolyadékából alkalmazott módszerek esetében (Olah és mtsai, 1988; Carlo-Stella és mtsai, 1996).

A programozott sejthalál vizsgálatánál 5×10^4 darab K562 sejtet kezeltünk 15 és 50 μM Ribavirinnel 6, 24 és 48 óráig. Az inkubációs periódus végén a sejteket $1 \times \text{PBS}$ oldattal mostuk át, majd centrifugálás után tárgylemezen mintaként 1000 hematoxilin-eozin festett sejten vizsgáltuk az apoptotizált sejtek számát az apoptózisra jellemző morfológiai változások alapján (apoptotikus „bleb”-ek képződése, fragmentálódott örökítőanyag és membránszerkezet, stb).

Az eritroid differenciációt vizsgáló kísérleteink során – korábbi tapasztalataink alapján – 15, 50 és 145 μM Ribavirinnel kezelt K562 sejteket használtuk, míg az IP6 eritroid differenciációt indukáló képességét 750 μM és 5 mM IP6 kezeléssel mértük K562 sejteken, 24 óránként 5 napos időtartamig. Minden mintából 1000 darab benzidin pozitív sejt mikroszkópos vizsgálatával állapítottuk meg a szerek differenciációt kiváltó hatékonyságát. Pozitív kontrollként heminnel kezelt sejteket alkalmaztunk (Olah és mtsai, 1988, Ogawa és mtsai, 1995).

3.3 Baktériumtörzsek és vektorok

A Northern analízishez kontrollként használt GAPDH gén szekvenciáját tartalmazó pBluescript II KS +/- vektort Prof. R. A Jensen (Vanderbilt University Nashville, TN, USA) bocsátotta rendelkezésünkre. A vektorban a T7

fágpromótértől 3' irányban található a cDNS 135 bázispár hosszú szakasza, antiszensz orientációban (689-től a 823. nukleotidig, ref: NM_002046). Ehhez a vektorhoz gazdasejtként az E. coli K12 HB101 törzset használtuk. A MYC onkogénre specifikus próbához pCR2.1-TOPO vektort használtunk, amelynek gazdatörzse a szintén E.coli-ból származó TOP10F One Shot baktériumtörzs volt (Invitrogen). Ebben az esetben a T7 fágpromótértől 3' irányban, antiszensz orientációban található a gén 2. exonja, illetve a 3.exon egy része (204 bp hosszú szakasz, 1136-1339, ref: NM_002467). A baktériumokat a szokásos mikrobiológiai feltételek mellett tenyésztettük ampicillin jelenlétében LB táptalajon: literenként 10g tripton, 5g élesztőkivonat, 5g NaCl és 15g agar; a táptalaj pH-ja 7,2 volt (Maniatis és mtsai, 1982). A tenyészeteket 2-3 hetente oltottuk át friss táptalajra.

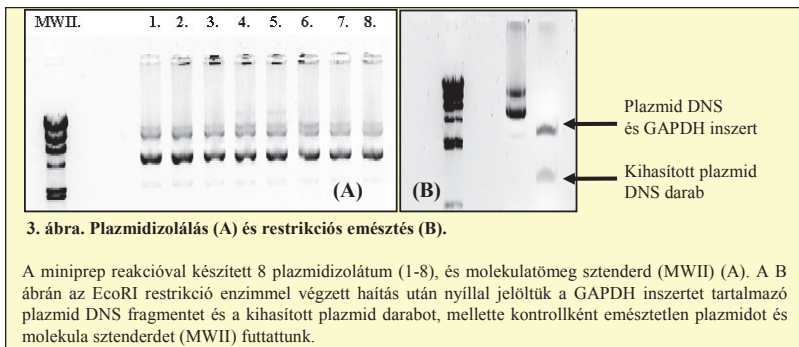
3.4 Gélelektroforézisek

Vizsgálatainkhoz vízszintes agaróz lapgéleket öntöttünk. A DNS minták vizsgálatához 1-2%-os agaróz gélét öntöttünk, ehhez 40 mM Tris-acetát/1 mM EDTA (pH=8,0) összetételű futtatópuffert használtunk. Az RNS mintákat 1%-os formaldehid tartalmú denaturáló SeaKem agaróz gélen futtattuk. Futtató pufferként 1×MOPS-ot használtunk és futtatás előtt a mintákhoz előre elkészített bróm-fenol-kék és xilol-cianolt tartalmazó festékoldatot adtunk. A nukleinsavakat etídium-bromiddal (EtBr) festettük meg; az RNS minták esetében magához a mintához, míg a DNS vizsgálatoknál a gélhez adtuk a festéket. A futtatás után a megfestett mintákat AlphaImager 2000 (Alpha Innotech) géldokumentációs rendszer segítségével detektáltuk, molekulatömeg standardok jelenlétében.

3.5 Plazmidizolálás

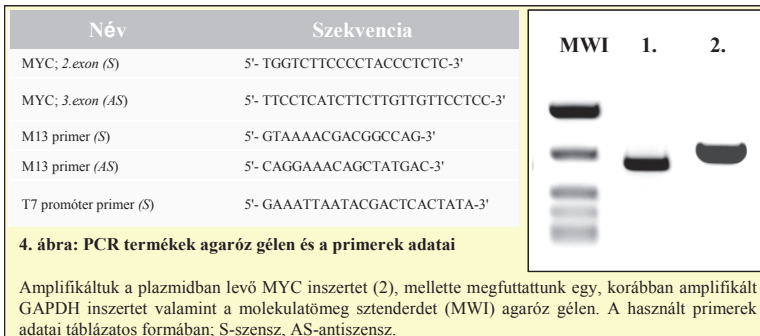
Az általunk használt módszer alapvetően megegyezik a széles körben elterjedt alkalikus lízis módszerrel (Maniatis és mtsai, 1982). A miniprep eljárás alapján a baktériumszuszpenzióból a sejteket 100 µl GTE oldatban vettük fel, majd 200 µl frissen készített 0,2 M NaOH - 1% SDS eleggyel kevertük össze,

ezután jégen inkubáltunk. A mintákhoz 150 μ l jéghideg 3M kálium-acetát oldatot adtunk, majd 6-8 percig centrifugáltuk 4°C-on, 12000 g-vel. A felülúszót azonos térfogatú fenol:kloroform eleggyel kevertük össze, végül a vizes fázisban levő plazmid DNS-t 2 térfogatnyi etanollal kicsaptuk, majd 10 percig 4°C-on 10000 g-vel centrifugáltunk. A kapott csapadékot rövid szárítás után, annak mennyiségétől függően 20-50 μ l TE oldatban oldottuk fel, amely 20 μ g/ml koncentrációban RNázt tartalmazott. A preparátum tisztaságát agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Későbbi vizsgálatainkhoz EcoR I enzimmal emésztett GAPDH plazmidot 1%-os agaróz gélen futtattuk meg (3. ábra).



3.6 Polimeráz láncreakció (PCR)

Vizsgálataink során egy *hot start* PCR reakció 40 μ l össztérfogatban zajlott le, amelynek összetétele: 1,5 mM $MgCl_2$, 0,02 mM négyféle dNTP, 20-200 ng DNS templát, 0,25 μ M szensz és antiszensz primer, 1 egység Taq polimeráz (Kwok és Higuchi, 1989). A reakciókat mindig megelőzte a minták 5 perces elődenaturációja 95°C-on, majd következett a 35-40 ciklus hosszúságú PCR, amelynek ciklusai a következőképpen épültek fel: denaturációs lépés (10 másodperc, 95°C), hibridizációs lépés (10 másodperc, 60°C), polimerizációs lépés (20 másodperc, 72°C). A PCR reakciókat 7 perces, 72°C-os inkubálás követte. A DNS termékek ellenőrzése agaróz gélelektroforézissel történt (4. ábra).



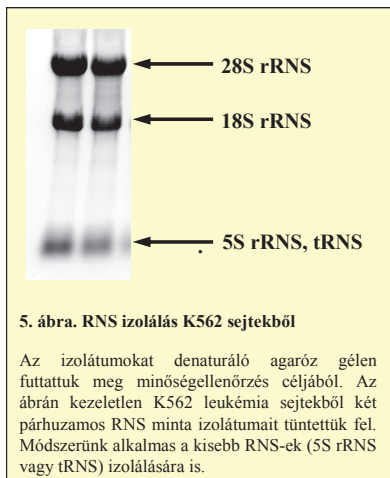
3.7. DNS szekvenálás

A be nem épült nukleotidoktól és primerektől meg kellett tisztítani a később szekvenálendő PCR amplikonokat, amelyet garnélarákból származó alkalikus foszfatáz (2 unit/μl) és exonukleáz I (10 Unit/μl) felhasználásával végeztünk (USB-Amersham). A megtisztított terméket a gyártó utasításait követve a BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) segítségével amplifikáltuk. A 26 ciklus hosszúságú reakció a következő ciklusokból állt: 30 másodperc, 96°C; 15 másodperc, 60°C és 4 perc, 60°C. A beépületlen fluoreszcens nukleotidokat izopropanolos kicsapással távolítottuk el. A csapadékot – a felülúszó leöntése után – 5 percig szobahőmérsékleten szárítottuk, majd a gyártó által forgalmazott Template Suppression Reagent (TSR) pufferének 15 μl-ében oldottuk fel. Az így kapott elegyet 3 percig 95°C-on denaturáltuk, majd 1-2 percig 4°C-ra helyeztük. A mintákat ABI PRISM 310 Genetic Analyzer automata szekvenáló berendezésen futtatuk és az adatokat ABI PRISM Sequencing Analysis 3.0 számítógépes program segítségével értékeltük (Applied Biosystems).

3.8 Teljes RNS izolálás a sejtenyészetből

Az adott Ribavirin mennyiséget (15, 50 és 150 μM) tartalmazó oldatot 3, 12 és 48 órán keresztül hagytuk a sejteken, míg ugyanezen időpontokban kezeletlen sejteket is összeszedtünk a génexpressziós vizsgálatok pontosabb összehasonlíthatósága miatt. Az IP6 kezelés esetén 30 és 60 percig 750 μM IP6-tal, valamint 12 óráig 5 mM IP6 oldattal kezelt K562 sejteket használtunk fel RNS izoláláshoz. Az RNS izolálásához a már előzőleg kezelt és a kezeletlen K562 sejtekből is 1-1 milliót tettünk 1 ml RNAlater oldatba (Ambion).

Az eljárás során minden esetben az Ambion cég RNAqueous termékét használtuk, a gyártó előírásait követve. Az RNS-ek tisztaságát, intaktságát és koncentrációját denaturáló agaróz gélen való futtatás követően spektrofotometriával, NanoDrop-pal valamint Agilent 2100 Bioanalyzer készülékekkel állapítottuk meg. Az izolálások során kapott RNS-ek minőségét az 5. ábra mutatja be. Az izolálás során használatos eszközök és oldatok előzőleg dietil-pirokarbonáttal (DEPC) voltak kezelve, az esetleges RNáz kontamináció megakadályozására (Maniatis és mtsai, 1982).



3.9 Radioaktív próba előállítása in vitro transzkripcióval

A módszer segítségével a Northern analízishez valamint a ribonukleáz védelmi reakcióhoz (RPA) állítottunk elő radioaktívan jelölt RNS próbákat.

A Northern eljáráshoz az Ambion cég MAXIScript T7 Kit-jét használtuk. A 20 µl össztérfogatú reakcióelegy 2 µl transzkripció puffert, 5 µl nukleázmentes vizet, 1-1 µl 10 mM-os ATP-t, CTP-t és GTP-t, 2 µl 100 µM koncentrációjú jelöletlen UTP-t, 5 µl [α -³²P]UTP-t, valamint 2 µl T7 polimeráz/RNazin-t tartalmazott. Templátként 0,5-1 µl adott koncentrációjú linerizált plazmid DNS-t (a GAPDH esetében), valamint ~ 300 µg/µl PCR terméket (a MYC esetében) alkalmaztunk. Az elegyet egy órán át 37°C-on inkubáltuk, majd hozzámértünk 1 egységnyi RNáz mentes DNázt, és még 15 percig inkubáltuk 37°C-on. Ezen lépésnek köszönhetően az enzim lebontotta a DNS templátot, majd következhetett a próba tisztítása, amely során a reakcióoldatot azonos térfogatú fenol:kloroform (1:1) eleggyel kevertük össze, majd 4°C-on, 10000 g-vel centrifugáltuk 5 percig. A felülúszót ammónium-acetáttal és abszolút etanollal kevertük össze, majd minimum 30 percre -70°C-ra tettük. Ezután a mintát 15 percig centrifugáltuk 4°C-on, 10000 g-vel. Az alkoholos kicsapás után eltávolítottuk az alkoholt, a radioaktív RNS mintát 20 µl RNáz mentes desztillált vízben vettük fel, és 1-2 napon belül felhasználtuk. A mintákat felhasználásig -20°C-on tároltuk.

3.10 Expressziós vizsgálatok Northern hibridizációval

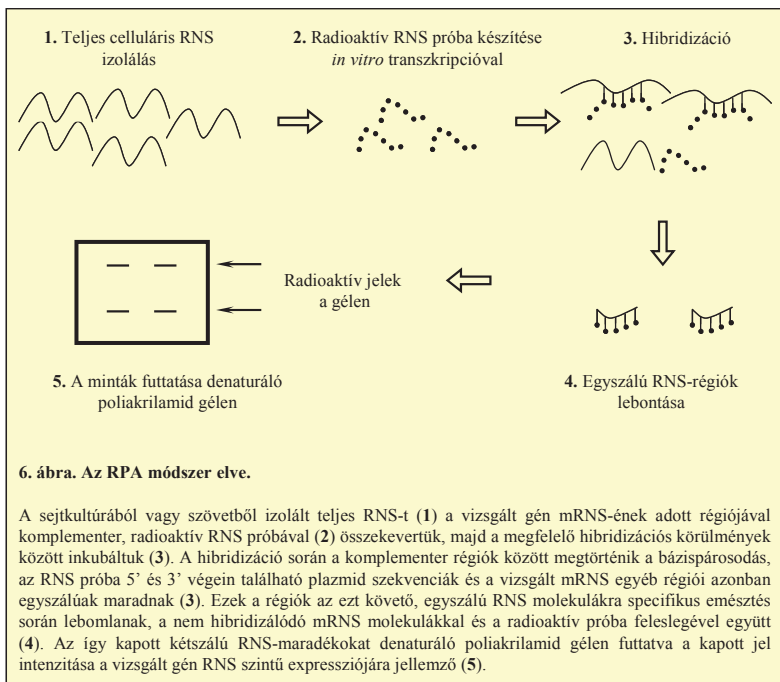
Kísérleteink előtt a fésűt, valamint a futtató kádat minimum 1 órán keresztül 5M NaOH oldatban áztattuk. A vizsgálandó RNS mintákat formaldehid tartalmú, denaturáló Sea Kem agaróz gélen futtattuk. A mintákat 15 percig 65°C-on denaturáltuk, majd jégre helyeztük, és 1 µl etidium-bromidot és 1 µl RNS mintafelviteli puffert adtunk hozzá (6X futtató puffer összetétele: 1,2% brómfenol-kék, 1,2% xilolcianol, 0,037% glicerin, 20 µl 0,5 M-os EDTA

(pH=8,0), 2,5 ml RN-áz mentes víz). Egy zsebbe egyféle mintából 5-20 µg RNS-t vittünk fel. Az 1×MOPS-ban, 40-60 mA-n végzett futtatást a mintafelviteli pufferben levő brómfenol-kék migrációja alapján követtük nyomon. A későbbi jel azonosításának céljából a gélrt vonalzó mellett lefényképeztük. Ezek után a gélrt 20 percig 10×SSC oldatban áztattuk, és az RNS-t kapilláris eljárás segítségével vittük át Hybond-N+, illetve -XL filterre (Amersham). A filtert átöblítettük 2×SSC oldatban, majd 10-15 percig szobahőmérsékleten szárítottuk. Az RNS-t a filteren ultraibolya fénnel (302 nm) és 3 perces expozícióval rögzítettük.

A kísérletek során az Ambion cég UltraHyb ultraszenzitív hibridizációs pufferét alkalmaztuk, mivel az irodalmi adatok arra utaltak, hogy megnövekedett hibridizációs jel mellett csökkentett háttérrel, valamint szenzitívebb és gyorsabb módszerrel dolgozhatunk. A módszer használata esetén a filterkészítésig a fenn leírtak szerint jártunk el. Ebben az esetben ugyanabban az oldatban végezhetjük a hibridizációt, mint amelyekben előtte minimum 30 percig előhibridizáltuk a filtert 68°C-on. Az elkészített, radioaktívan jelölt próbához az UltraHyb speciális összetételének köszönhetően a nem specifikus tapadási helyek elfedésére használatos lazachere DNS-t sem kellett alkalmaznunk. A 68°C-on végzett, egy éjszakán át tartó inkubáció után 2 x 5 perces 2×SSC-0,1% SDS, illetve 2 x 15 perces 0,1×SSC-0,1% SDS oldattal mostuk a filtert. A kapott jelek detektálása PhosphorImager 445 SI (Molecular Dynamics) készülék segítségével történt, az értékeléshez a ImageQuant képanalízis programot (Molecular Dynamics) használtuk.

3.11 Expressziós vizsgálatok ribonukleáz védelmi reakcióval (RPA)

Vizsgálatainkhoz a Promega cég által forgalmazott RNase Protection Assay System Kit-et használtuk. A módszer elvét a **6. ábra** mutatja be. A vizsgálatok során 20 µg teljes RNS-ből indultunk ki, amelyhez hozzáértünk 1 µl 5×10^5 cpm/µl aktivitású radioaktív RNS próbát, 0,1 térfogat 3M nátrium-acetátot (pH=4,3) és 2,5 térfogat abszolút etanolt, majd az elegyet -20°C-on 30 percig

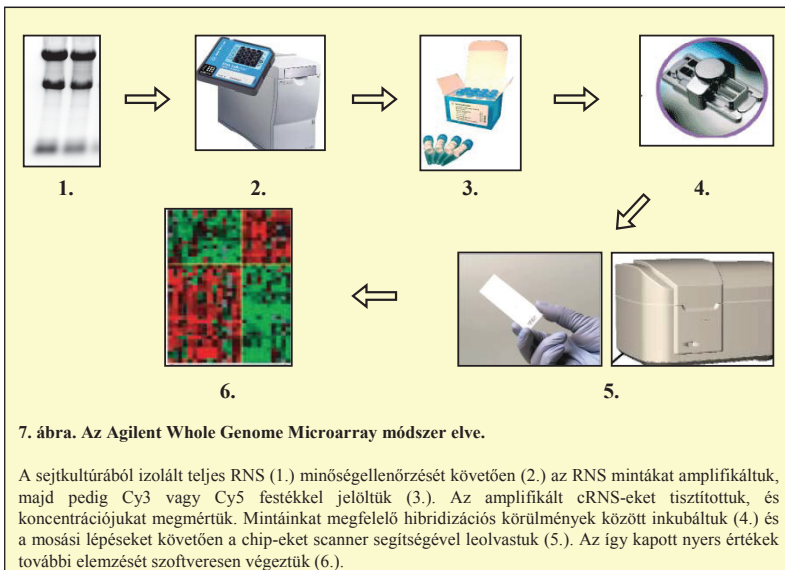


inkubáltuk. Ezt követte a minta 15 perces centrifugálása 4°C -on, 10000 g-vel, majd a felülszó óvatos eltávolítása. A kapott csapadékokat 20 µl hibridizációs oldatban vettük fel (összetétel: 80% deionizált formamid, 1 mM EDTA (pH=8,0), 40 mM PIPES, 0,2 M nátrium-acetát). Oldódás után a mintát 5 percig 95°C-on denaturáltuk, majd egy éjszakán át 55°C-on inkubáltuk. A hibridizációt követően a mintához hozzámértünk 180 µl RNáz puffert (összetétel: 10 mM Tris (pH=7,5), 5mM EDTA (pH=8,0), 0,2 M nátrium-acetát), majd az erőteljes összekeverés után 1 µg RNS mennyiségenként 0,2 egység RNázt. Az elegyet 1 órán keresztül szobahőmérsékleten (22-25°C) inkubáltuk, majd az emésztést 20 µl „stop oldat” (10% SDS, 1 µg/µl tRNS) hozzáadásával állítottuk le. Ezután a mintát 2,5 térfogatnyi abszolút etanollal összekeverve -70°C-on kicsaptuk, majd az oldatot

15 percig, 4°C-on, 10000 g-vel centrifugáltuk. A csapadékot rövid, 3 perces szárítás után 10 µl futtató pufferben (80% deionizált formamid, 1 mM EDTA, 0,1% bróm-fenol-kék, 0,1% xilol-cianol, 0,1% SDS) szuszpendáltuk, majd 5 percig 95°C-on és 2 percig jégen inkubáltuk. A mintákat denaturáló poliakrilamid gélen (6% akril-amid, 7,7 M urea) futtattuk, általában 2-2,5 óráig, 50°C-on. A gél szárítása után a radioaktív jeleket PhosphorImager 445 SI készülék (Molecular Dynamics) segítségével detektáltuk. Az eredmények kvantitatív értékeléséhez az ImageQuant képanalízis programot (Molecular Dynamics) használtuk.

3.12 *Microarray* vizsgálatok

Kísérleteink előtt a felhasznált RNS-ek minőségi és mennyiségi ellenőrzésére az Agilent 2100 Bioanalyzer készüléket használtuk. Kísérleteink első fázisában a 30 és 60 percig 750 µM IP6-tal valamint a 12 óráig 5 mM IP6-tal kezelt és kontrollként kezeletlen K562 sejtek különböző izolálásából származó RNS mintáival dolgoztunk. Vizsgálatainkhoz minden időpont és kezelés esetén 3 független izolátumot összekevertük. Minden esetben a microarray kísérletekhez használt RNS minták amplifikálását és Cy3 vagy Cy5 festékkel történő jelölését az Agilent cég Low Input Amplification Kit-jével végeztük, a gyártó előírásait követve. Az amplifikált cRNS-eket RNeasy Mini Kit-tel (Qiagen) tisztítottuk, majd koncentrációméréshez a NanoDrop készüléket használtuk. Az 1-1 µg Cy3 és Cy5 jelölésű cRNS-eket, fragmentálást követően, a microarray lemezekre hibridizáltuk (In situ Hybridization Kit Plus, Agilent) a gyártó cég protokolját követve. A lemezeken előre megtervezett, 60 nukleotid hosszúságú oligonukleotidok reprezentálták a teljes humán transzkriptomot 41000 próba segítségével. A módszer alapjait a **7. ábra** mutatja be.



A transzkriptek teljes listája az *array*-t megvásárlók részére hozzáférhető az Agilent internetes oldalán (<http://www.agilent.com>). Ugyanannak a mintának az ellenkező festékekkel történő jelölése – azaz a *dye swap* – a gyártó utasításai szerint történt. A hibridizációt (60 °C-on 17 óra) követően a lemezeket SSPE oldattal mostuk és a festékek védelméhez szükséges oldattal kezeltük a gyártó előírásait követve. A fluoreszcencia intenzitásértékeit Agilent Microarray Scanner-rel mértük és az értékeket az Agilent Feature Extraction Software (v.A.7.5.1) segítségével kaptuk meg. A nyers adatok kiértékelése Rosetta Luminator System szoftverrel történt (Rosetta Biosoftware). A microarray vizsgálatok adatainak egyszerűbb áttekinthetőségének érdekében a PANTHER (Mi és mtsai, 2005) útvonalelemző szoftvert alkalmaztunk. Az eredmények statisztikai értékelésekor az egyes változók összehasonlításához variancia analízist (ANOVA) használtunk, és a $p < 0,05$ valószínűségi értéket fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

3.13 Reverz transzkripció

Az IP6 kezelés után izolált RNS minták reverz transzkripciója során 0,1-1 µg teljes RNS-ből indultunk ki, amelyből a GeneAmp RNA PCR Kit (Applied Biosystems) használatával cDNS-t készítettünk, a gyártó utasításait követve. Az RNS-hez mért reakcióelegy összetétele: 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris (pH=8,3), 1-1mM dATP/dCTP/dGTP/dTTP, 20 egység RNazin, 2,5 µM random hexamer-keverék és 50 egység MuLV reverz transzkriptáz. Az elkészített cDNS-t templatként használtuk az ezt követő kvantitatív *real-time* PCR reakciókban.

A 15 és 50 µM Ribavirinnel kezelt RNS minták független izolátumaiból 3-3 mintát egyenlő koncentrációban kevertünk össze (*pool*-ozott RNS minták). Ezen keverékekből készítettünk cDNS mintákat, amelyeket 125 U Multiscribe reverz transzkriptáz enzimmel készítettünk a High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) kittel, követve a gyártó utasításait.

3.14 Kvantitatív *real-time* PCR vizsgálatok (Q-RT-PCR)

A microarray adatok alapján kiválasztott gének expressziójára gyakorolt szerhatást vizsgáltuk kvantitatív valós idejű PCR módszerrel. A génexpresszió mérésére – a pontos kvantifikálás és a microarray eredmények validálása érdekében – az adott gén összes mRNS variánsát mérő TaqMan Gene Expression Assay-ket választottuk ki (Applied Biosystems). Ezen gének és az alkalmazott *assay*-k azonosítója a **3. táblázat**ban található. A reakciók (kétlépéses, 40 ciklus hosszúságú: 15 másodperc 95°C és 1 perc 60°C) ABI Prism 7900HT Sequence Detection System készüléken futottak 20 µl végtérfogatban, amely az adott génexpressziós *assay*-t, TaqMan Universal Mastermix-et és a vizsgált minta cDNS templatját tartalmazta. Minden cDNS minta vizsgálata az adott génre három ismételtesben történt. Az eredmények értékelése a készülék Sequence Detector Software SDS 2.0 (Applied Biosystems) szoftverével történt a $2^{-\Delta\Delta Ct}$

módszer (Livak és Schmittgen, 2001) alkalmazásával, $\beta 2$ microglobulin és RPLP0 belső kontrollgének génexpressziós átlagához viszonyítva.

3. táblázat: A kvantitatív valós idejű PCR vizsgálatok során használt assay-k adatai

Gén azonosító	Génnev	ABI Assay azonosító
C-MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	Hs00153408_m1
Ki-RAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	Hs00364282_m1
Ha-RAS	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	Hs00610483_m1
hTERT	telomerase reverse transcriptase	Hs00162669_m1
p21 ^{CIP1/WAF1}	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	Hs00355782_m1
Globin A	hemoglobin, gamma A	Hs01629437_s1
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Hs00153350_m1
BAX	BCL2-associated X protein	Hs00180269_m1
TP53	tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	Hs00153349_m1
ABL1	c-abl oncogene 1	Hs00245445_m1
b3a2	BCR-ABL fusion gene, major transcript variant b3a2	Hs03024541_ft
b2a2	BCR-ABL fusion gene, major transcript variant b2a2	Hs03024435_ft

m1: csak mRNS variánsokat detektáló assay, exon-exon határra tervezve

s1: 1 exonos génre tervezett assay

ft: fúziós transzkriptre tervezett assay

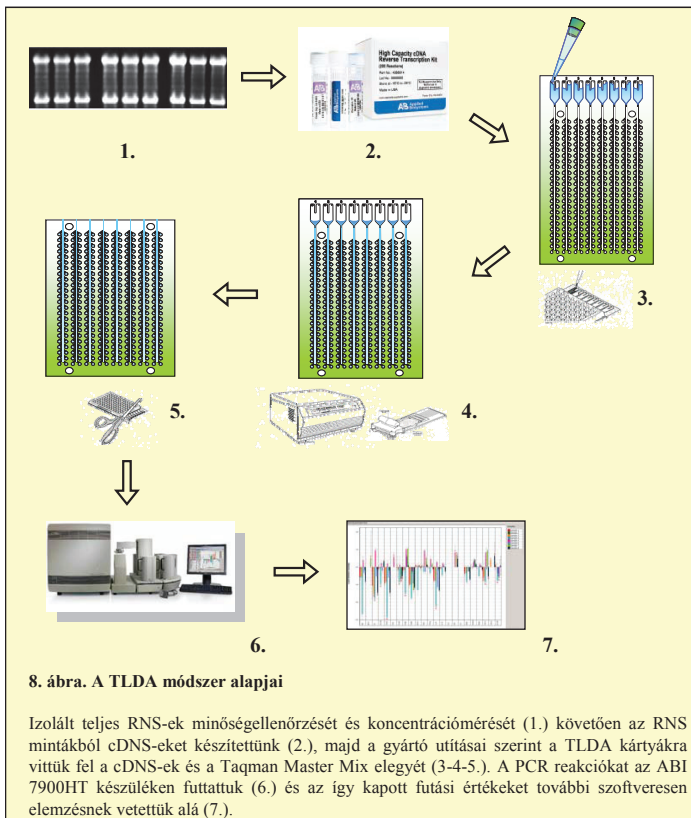
3.15. Taqman kis-denzitású génexpressziós array (TLDA)

Az 50 μ M Ribavirinnel kezelt sejtekből izolált RNS-ekből cDNS-eket készítettünk, majd Taqman kis-denzitású génexpressziós array-eken vizsgáltuk tovább (*Taqman Low-Density Gene Expression Array*, Applied Biosystems). Az array egy előre gyártott, 384 darab Taqman génexpressziós assay-t tartalmazó kártya. Ezzel a megoldással 1 μ l végtérfogatban is végezhető Q-PCR reakció. Az általunk szabadon meghatározott vizsgálati felépítésben, egy kártyán kettő mintát futtattunk, így duplikátumban 96 darab gén együttes vizsgálatára nyílt lehetőség. Minden reakcióhoz 600-800 ng RNS-ből átírt cDNS-sel egyenlő mennyiséget alkalmaztunk, amelyek az adott minta esetén vízzel és Taqman Universal MasterMix-szel 100 μ l-re hígultak. A kísérletek előtt készített cDNS-ek minőségellenőrzése, valamint mennyiségük normalizálása real-time PCR

reakcióval és 18S rRNS-re specifikus Taqman *assay* segítségével történt. A 96 gén kiválasztásánál figyelembe vettük a fontosabb daganatspecifikus útvonalakat, valamint korábbi vizsgálataink eredményeit is. A gének kifejeződésének vizsgálatához az adott gén összes mRNA variánsát mérő *TaqMan Gene Expression Assay*-ket választottuk ki, lehetőség szerint az exon-exon határra tervezett Taqman próbákat tartalmazó *assay*-ket alkalmaztuk, kiküszöbölve ezzel a lehetséges DNS kontaminációból adódó hibákat. Ezen gének és az alkalmazott *assay*-k azonosítója az **1. számú melléklet**ben található. A módszer alapjait a **8. ábra** mutatja be.

3.16. A TLDA eredmények szoftveres és statisztikai értékelése

A kártyák futtatását követően az abszolút ciklushatár (Ct értékek) meghatározását Sequence Detection Software v.2.1 (Applied Biosystems) szoftverrel végeztük el. Az adatok normalizálására minden 96-os géncsoport esetén kettő lehetséges belső kontrollgént választottunk a StatMiner v2.1 szoftver (Integromics) segítségével. Ezen kontrollgének Ct értékeinek a varianciája kezelt és kontroll mintáinkban is alacsony értéket mutatott. A génexpressziós profilok meghatározására alkalmazott legelterjedtebb módszert választottuk ki, az ún. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszert (Livak és mtsai, 2001), amellyel a vizsgálni kívánt gének expressziós szintjét a $\beta 2$ microglobulin és RPLP0 belső kontrollgének génexpressziós átlagához viszonyítottuk annak érdekében, hogy a szignifikáns változást mutató ($p < 0,05$), hasonló expressziós profillal rendelkező csoportokat együtt is vizsgálhassuk. Az eredmények vizuális ábrázolását a JcolorGrid v1.57 szoftverrel végeztük (Joachimiak és mtsai, 2006). Amplifikációs hibák miatt 9 gént kizártunk a további értékelésből. Az idő-független expressziós változásokat ImageJ v1.39 szoftverrel, az alkalmazott kezelési idők és expressziós profilok által alkotott görbe alatti terület felhasználásával számoltuk (Abramoff és mtsai, 2004). A géntermékek molekuláris funkció szerinti besorolását a PANTHER v2.5 útvonal elemző szoftverrel végeztük.



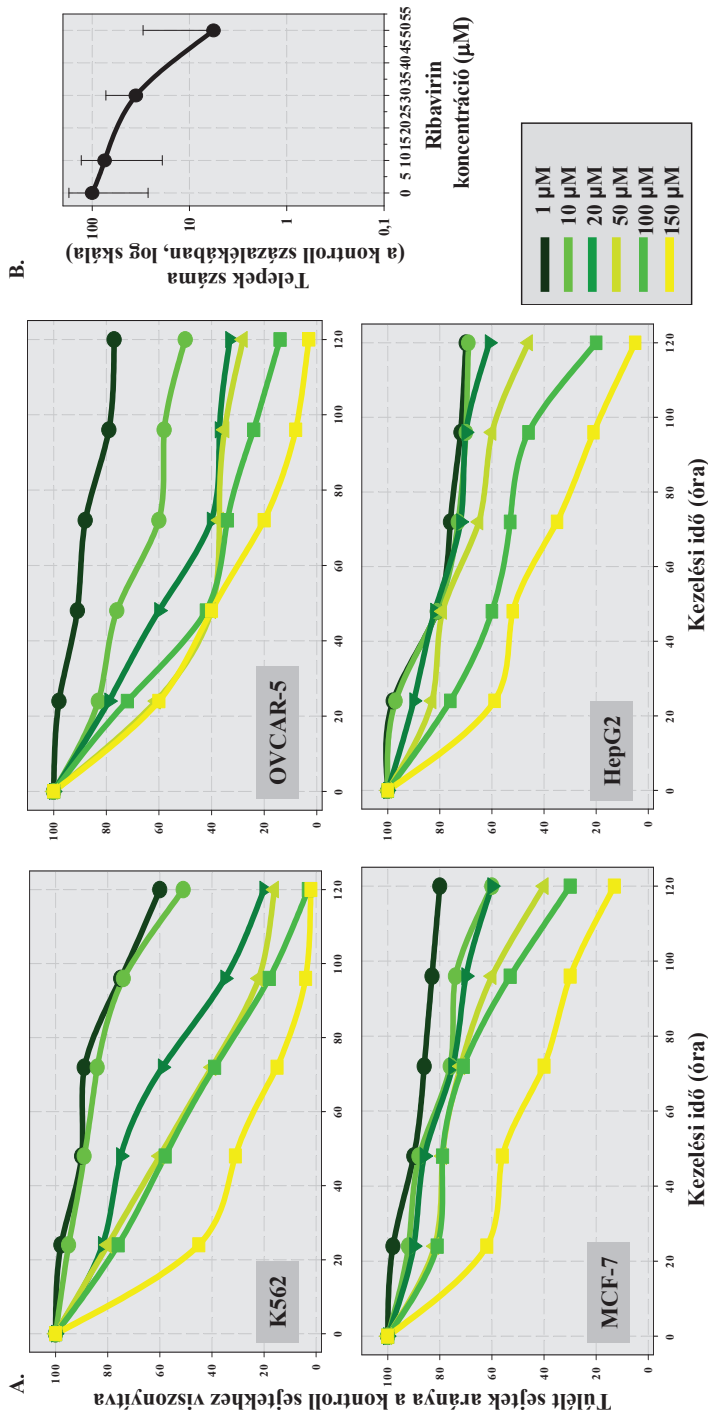
4 EREDMÉNYEK

4.1 Sejtélettani hatásvizsgálatok

4.1.1 A Ribavirin kezelés sejtélettani hatásainak vizsgálata

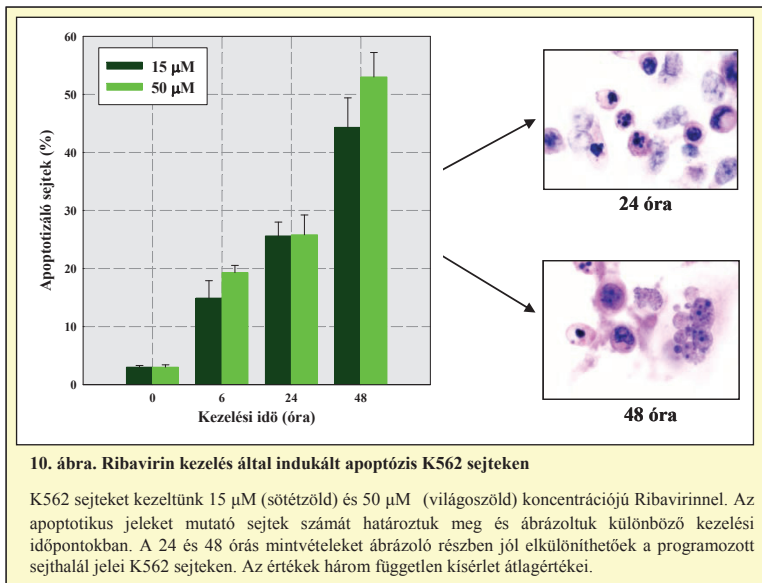
Vizsgálataink alapvető célja annak felderítése volt, hogy a Ribavirin – gyógyászatban ismert vírusellenes alkalmazásától függetlenül – hatásos lehet-e daganatsejtek szaporodásának gátlásában is. Ezen kérdés megválaszolásának érdekében különböző koncentrációjú Ribavirin oldattal kezeltünk leukémia sejteket (K562), petefészek karcinóma sejteket (OVCAR-5), emlőtumor sejteket (MCF-7) valamint hepatocelluláris karcinóma sejteket (HepG2). A kezelt sejtek túlélési arányát a kezeletlen sejtek számának százalékában adtuk meg. Kimutattuk, hogy Ribavirin kezelés hatására a vizsgált daganatsejttenyészetek sejteinek szaporodása lecsökken. Összességében a Ribavirin sejtprolifерációt gátló hatása jelentősen megemelkedett a kezelések idejének és az alkalmazott koncentrációjának növelésével **(9/A. ábra)**. A 120 óránál mért IC_{50} értékek jól tükrözik a különböző idejű kezelések hatékonyságát ($IC_{50} = 15 \mu M$ a K562 leukémia, $45 \mu M$ a HepG2 sejtek, $35 \mu M$ az MCF-7 és $10 \mu M$ az OVCAR-5 sejtek esetében). K562 sejtekkel végzett vizsgálataink tekintetében $15 \mu M$ -os IC_{50} értéket kaptunk lágyagar módszerrel is a kezelés 14. napját követően **(9/B. ábra)**.

Ezen kísérleteinket követően a későbbiekben is a K562 leukémia sejttényszetet használtuk, mivel további sejtteni valamint genomikai kérdéseink megválaszolásának alapmodelljeként a leukemiát, mint daganatfajtát céloztuk meg. A daganatsejtek szaporodásának gátlása mellett kérdéses volt, hogy a Ribavirin kezelés által generált sejtélettani változások kapcsolatba hozhatóak-e a programozott sejthalál ismert jellemzőivel (apoptotikus „bleb”-ek kialakulása, citoplazmatikus fragmentálódás). Sikertült bebizonyítanunk, hogy a Ribavirin a K562 sejtpopulációban apoptózist indukál, amely a kezelési dózis és az idő függvényében növekszik. Ezen kísérleteink eredményeit szemléleteti a **10. ábra**.



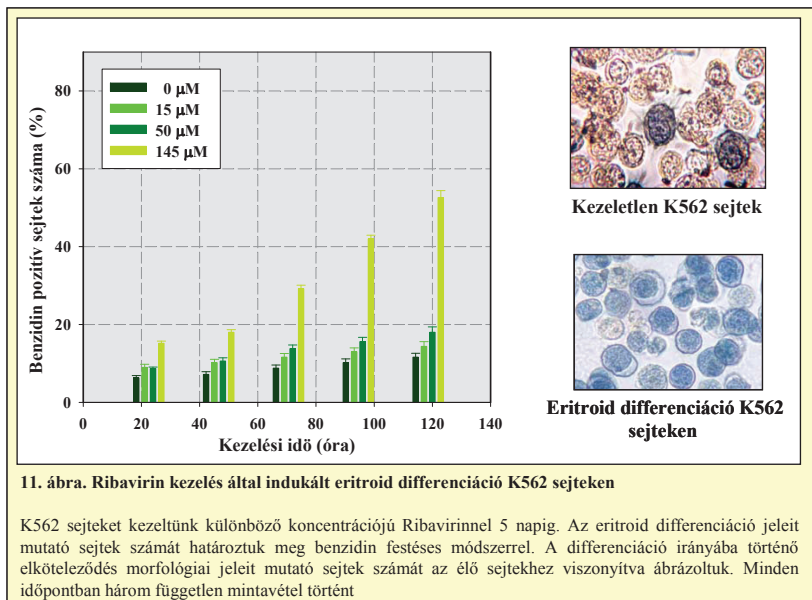
9. ábra. Ribavirin kezelés által indukált antiproliferatív hatás daganatsejttenyészeteken

K562, OVCAR-5, MCF-7 és HepG2 sejteket kezeltünk Ribavirinnel 5 napig. Tripánkek festéssel határoztuk meg az elhalt és az élő sejtek arányát (függőleges tengelyen a tülett sejtek százalékos aránya a kontroll mintákhoz viszonyítva). Minden kezelési időpontban mintákat vettünk az élő sejtek megszámlálása céljából az IC_{50} értékek meghatározásához (A). Az értékek három független kísérlet átlagértékei, minden esetben a szórás kevesebb volt mint 10%. Lágyagar vizsgálattal a Ribavirin kezelést (10, 30 és 50 µM) követő 14. napon határoztuk meg a szer IC_{50} értékét K562 sejtekben (B).



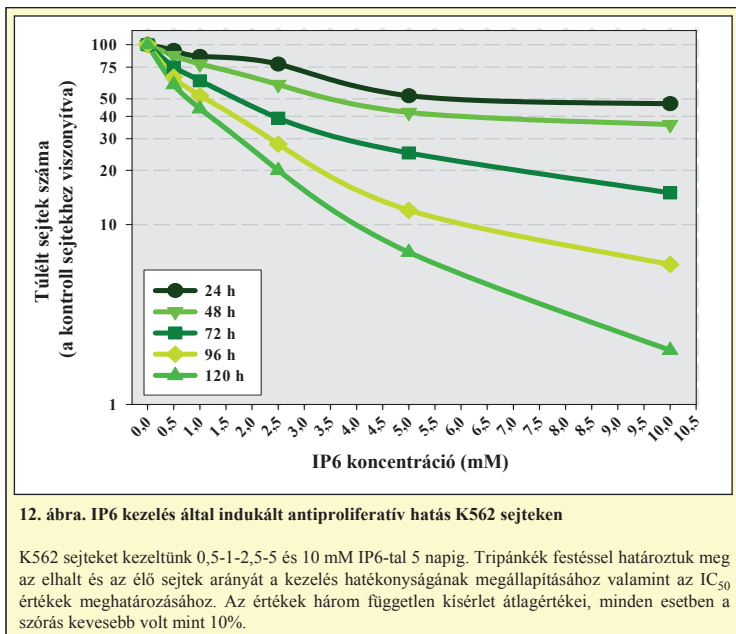
Vizsgáltuk annak lehetőségét is, hogy a Ribavirin kezelés az apoptózis-indukció mellett képes-e differenciációt kiváltani K562 sejtekben. Benzidin festés módszerével a sejtek eritroid differenciáció irányába történő elköteleződésének jeleit azonosítottunk, és a 96 és 120 óráig kezelt sejtek esetében és a differenciálódott sejtek száma az alkalmazott szerkoncentráció és az idő emelésével együtt növekedett. Nagy koncentrációban (145 μM) alkalmazott Ribavirin kezeléssel 120 óránál már ötszörös emelkedést tapasztaltunk a differenciálódó sejtek tekintetében **(11. ábra)**.

Génexpressziós vizsgálatainkhoz az alacsony koncentrációjú (1, 10 és 15 μM) Ribavirin oldatokat valamint a nagyobb dózisú kezeléseket (50 μM) is alkalmaztuk.



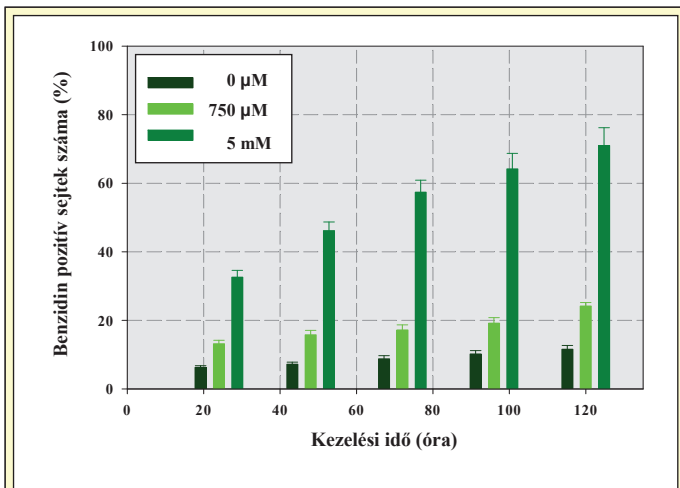
4.1.2 Az IP6 kezelés sejtelettani hatásainak vizsgálata

Vizsgálataink másik fő céljának tekintettük az IP6 kezelés sejtelettani hatásainak felderítését K562 leukémia sejteken. Arra is szerettünk volna választ kapni, hogy vajon hasonló jelenségek tapasztalhatók-e az általunk vizsgált két szer hatása tekintetében ezen a leukémia sejtvonalon. A K562 sejteket ezért 0,5-1-2,5-5 és 10 mM koncentrációjú IP6 oldattal kezelve, a kezelés 5 napja alatt mintákat véve határoztuk meg a élő és elhalt sejtek arányát. A kontroll és az elhalt sejtek aránya a kezelési dózis és az idő függvényében csökkenő tendenciát mutatott (12. ábra). Az IC₅₀ értékeket a regressziós görbe illesztés módszerével határoztuk meg.



Mint ahogy a Ribavirin esetében, úgy itt is felvetődött a kérdés, hogy az IP6 kezelés által kiváltott sejtpusztulás kapcsolatba hozható-e az apoptózissal. Vizsgálataink alapján kiderült, hogy az IP6 sejtpusztító hatása mellett nem tapasztalhatóak az apoptózis jellegzetes jelei, mindinkább a nekrosis morfológiai jeleit lehetett megfigyelni (nem mutatott adat).

A Ribavirinhez hasonló kísérleti elrendezésben vizsgáltuk ezt követően az IP6 differenciációt indukáló hatását. A kezelés 120. órájában mért IC₅₀ értékhez tartozó 750 µM-os IP6 oldatot, valamint a 24 órás IC₅₀ értékhez tartozó 5 mM-os IP6 oldatot alkalmaztuk. Már 24 órát követően 10%-kal (750 µM IP6-tal) illetve 35%-kal (5mM IP6-tal) volt nagyobb az eritroid differenciációt mutató benzidin pozitív sejtek száma a kontroll mintákhoz képest. A kezeléssorozat 5. napján történt mintavétel során karakterisztikus, 70% volt a nagyobb koncentrációjú oldattal kezelt sejteknél a benzidin pozitív sejtek száma, és ez hatszoros emelkedést jelentett. Kisebb, kétszeres emelkedést tapasztaltunk a kisebb IP6 mennyiséget tartalmazó oldattal való kezelést követően ugyanebben az időpontban (13. ábra).



13. ábra. IP6 kezelés által indukált eritroid differenciáció K562 sejteken

K562 sejteket kezeltünk 750 μM és 5 mM IP6-tal 120 óráig. Meghatároztuk az eritroid differenciáció jeleit mutató sejtek számát különböző kezelési időpontokban történt mintavételek segítségével. Az értékek három független kísérlet átlagértékei.

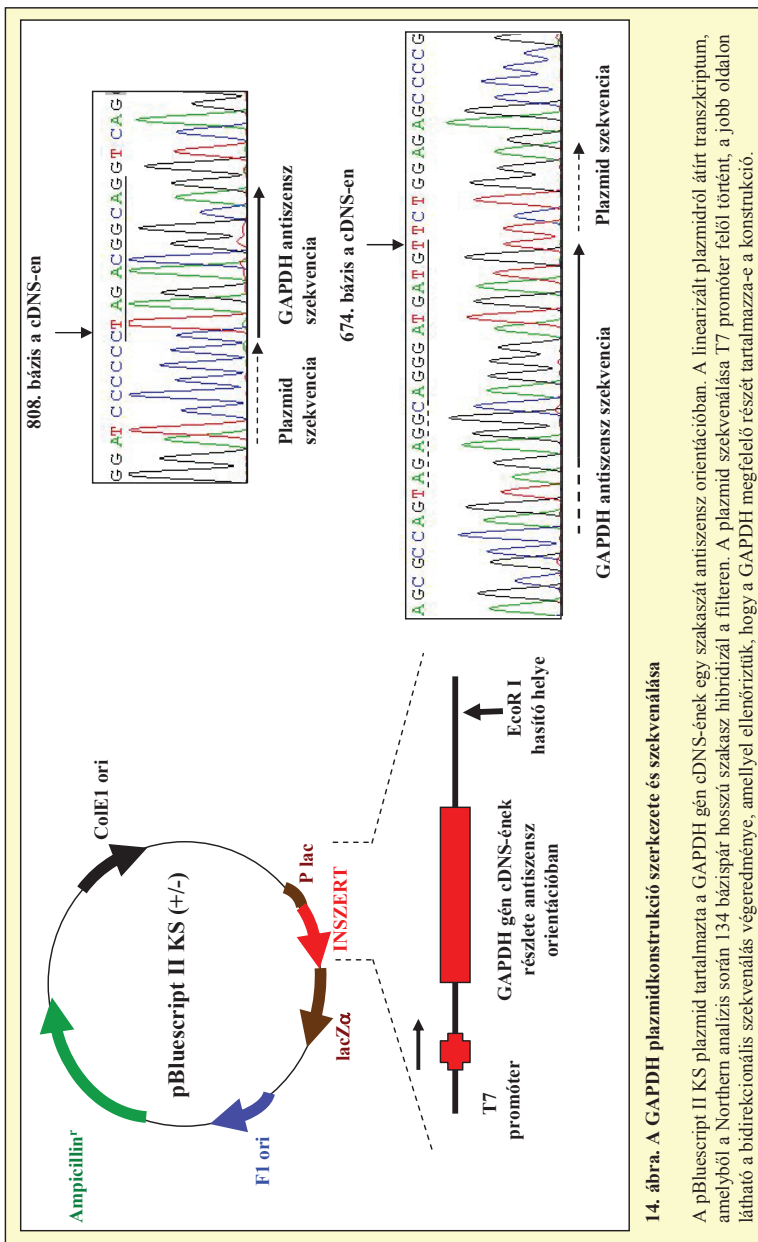
Az IP6-tal történt vizsgálataink eredménye alapján elmondható, hogy az IP6 nem indukált jelentős sejtpusztító hatása mellett apoptózist K562 leukémia sejtenyészetben azonban az eritroid differenciáció kiváltásában az alkalmazott szer koncentrációjának növelésével szoros összefüggést mutat. Későbbi molekuláris vizsgálatainkhoz is a kezelés 120. órájában mért IC_{50} értékhez tartozó 750 μM -os IP6 oldatot, valamint a 24 órás IC_{50} értékhez tartozó 5 mM-os IP6 oldatot használtuk.

4.2 Génexpressziós profilmeghatározások

4.2.1 Génexpresszió meghatározása Northern hibridizációval

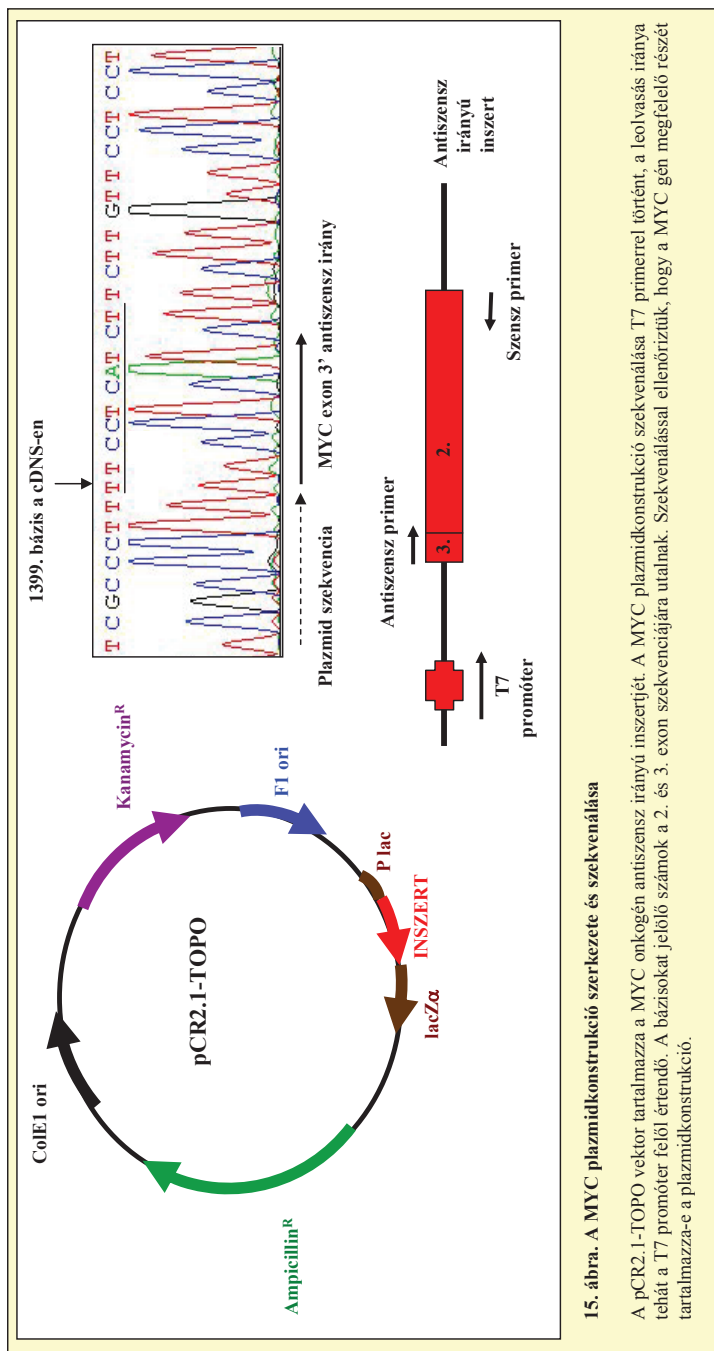
Optimalizáltuk a Northern analízis körülményeit és in vitro transzkripcióval készítettünk radioaktívan jelölt RNS próbákat, amelyeket mind a Northern analízishez, mind pedig a későbbi RPA reakciókhoz használtunk. A Northern módszer során használt plazmid a T7 fág promótortól 3' irányban inszertként tartalmazta az adott gén jelölni kívánt régiójának cDNS szekvenciáját antiszensz orientációban.

A vizsgálatainkhoz az alkalmazott plazmidban a T7 promóter végétől 3' irányban található a humán GAPDH gén cDNS-ének 135 bázispár hosszú részlete antiszensz orientációban. Az inszert és a promóter közötti régió, illetve maga az inszert szekvencia sem tartalmazott EcoRI hasítóhelyet, ezért bizonyult alkalmasnak az 5' túlnyúló véget létrehozó enzim a plazmid emésztéséhez. Tulajdonképpen az enzim egy, az inszertet is tartalmazó darabot vágott ki a plazmidkonstrukcióból. A plazmidszekvencia végső ellenőrzését DNS szekvenálással végeztük el, amelyhez M13 fág primert használtunk, mivel a T7 promóter ettől a primertől 3' irányban, ugyanolyan orientációban található, ezért az eredményként leolvasott szekvencia megegyezett a plazmidról T7 RNS polimerázzal, az in vitro transzkripció folyamán átírt, beklónozott szekvenciával. A GAPDH inszertet tartalmazó plazmid szerkezetét és szekvenálásának eredményét az **14. ábra** mutatja be. A Northern analízishez használt humán MYC próba előállításához már rendelkezünk a gén 2. és 3. exonjának 203 bázispár hosszú cDNS szakaszát tartalmazó plazmidkonstrukcióval, amelyben a T7 promótortól 3' irányba, 69 bázispár távolságra helyezkedik el az inszert. Ezt a régiót a klónoztuk a pCR2.1-TOPO vektorba. Kísérleteinkben a már korábban PCR módszerrel amplifikált terméket használtuk fel. A MYC szekvenciát tartalmazó PCR termék ellenőrzését DNS szekvenálással végeztük el. Ezt a fragmentumot T7 fág promóter és a MYC szensz primerrel reamplifikáltuk, majd végeredményképpen az így kapott régiót használtuk fel az in vitro transzkripció során specifikus RNS próba készítésére (**15. ábra**).



14. ábra. A GAPDH plazmidkonstrukció szerkezete és szekvenálása

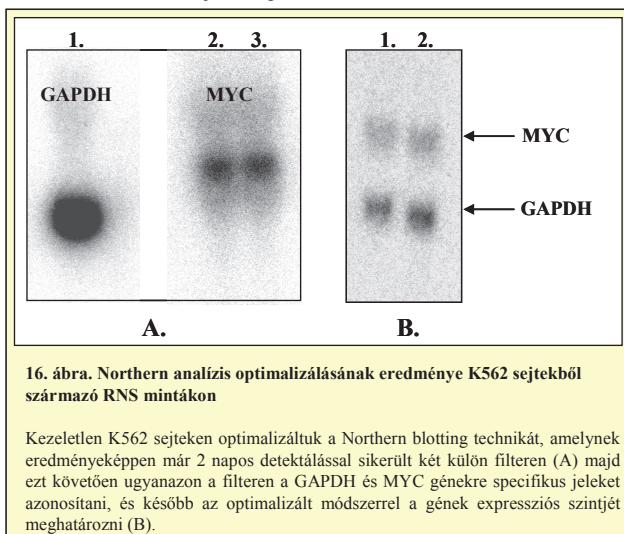
A pBluescript II KS plazmid tartalmazta a GAPDH gén cDNS-ének egy szakaszát antiszensz orientációban. A linearizált plazmidról ártir transzkriptum, amelyből a Northern analízis során 134 bázispár hosszú szakasz hibridizál a filteren. A plazmid szekvenálása T7 promóter felől történt, a jobb oldalon látható a bidirekcionális szekvenálás végeredménye, amellyel ellenőriztük, hogy a GAPDH megfelelő részét tartalmazza-e a konstrukció.



15. ábra. A MYC plazmidkonstrukció szerkezete és szekvenálása

A pCR2.1-TOPO vektor tartalmazza a MYC onkogén antiszensz irányú inszertjét. A MYC plazmidkonstrukció szekvenálása T7 primerrel történt, a leolvadás iránya tehát a T7 promóter felől értendő. A bázisokat jelölő számok a 2. és 3. exon szekvenciájára utalnak. Szekvenálással ellenőriztük, hogy a MYC gén megfelelő részét tartalmazza-e a plazmidkonstrukció.

A hagyományos módszer alkalmazása során több olyan kritikus lépés van, amelyek fejlesztésével képesek voltunk a Northern technika érzékenységén javítani. Ilyenek voltak az alkalmazandó hibridizációs puffer és hőmérséklet, valamint a nitrocellulóz filter helyes megválasztása. Először egy, a hagyományos módszer előírásait követő kontroll kísérlet beállítását és reprodukálását végeztük el. A hagyományos DNS próbák helyett, a fent leírtak alapján előállított GAPDH és MYC RNS próbákat alkalmaztunk, és a templát RNS minta a humán K562 krónikus mieloid leukémia sejtvonalból izolált teljes RNS volt. A kísérlet során a hagyományos előírásoknak megfelelően a prehibridizációs és hibridizációs lépés is 65°C-on történt, és az egyes próbák feltapadását először külön-külön végeztük. Előkísérleteink eredményeit a **16/A. ábra** szemlélteti. Következőekben a hibridizációs hőmérséklet továbbra is az RNS próbák használatánál ajánlott 65°C volt, és kíváncsiak voltunk arra, hogy alkalmazható-e a két próba ugyanannak a mintának a jelölésére. A **16/B. ábrának** megfelelően eredményesnek bizonyult a több próbával való közös jelölés is. Ezek után kezdtük el az Ambion cég UltraHyb ultraszenzitív hibridizációs pufferét használni és elvégeztük – az eddig használt K562-ből származó RNS mintákon – a hagyományos módszer és az UltraHyb-et alkalmazó protokoll szerinti technikák összehasonlítását. Végeredményképpen az UltraHyb puffert és a Hybond N+ filtert alkalmazó módszerrel csökkentett háttér mellett megnövekedett hibridizációs jelet kaptunk.

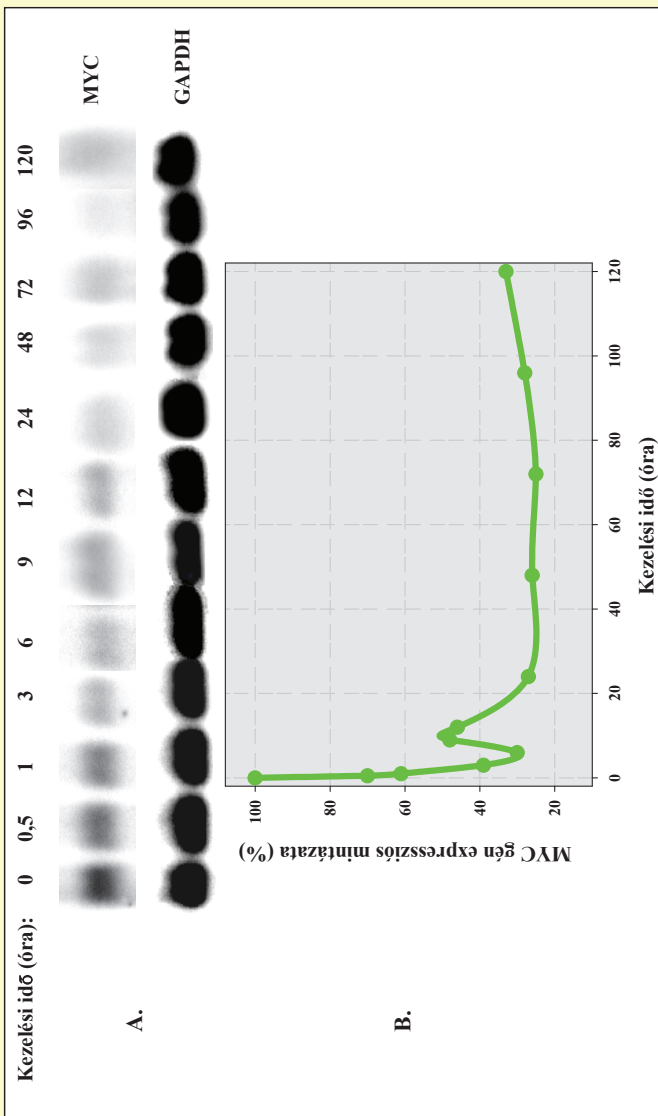


A módszer optimalizálását követően kíváncsiak voltunk arra, hogy K562 leukémia sejtekben az IMPDH enzim aktivitását gátló Ribavirin képes-e a MYC onkogén expresszióját csökkenteni. A dózis (10 μ M) kiválasztása előkísérleteink figyelembe vételével történt és az expressziós vizsgálatok során a GAPDH gént használtuk belső kontrollként.

A kezelt sejtekből származó teljes RNS mennyiségen végzett kísérlet sorozat eredményeként a MYC onkogén mRNS szintjének csökkenését tudtunk azonosítani. A MYC onkogén expressziójának csökkenése a kezelési idő függvényében változott, és ezen folyamat dinamikájának meghatározása volt kísérlet sorozatunk fő célja, amelyet a kontroll mintában megfigyelt, referenciaként tekintett MYC kifejeződéséhez viszonyítottunk. A kezelés eredményeként egy korai, és egy késői választ tudtunk detektálni. A korai hatás tanulmányozása során megfigyeltük, hogy már kevesebb, mint 1 órás kezelés is 40%-os csökkenést okoz a MYC mRNS mennyiségében. Ezt követően az onkogén kifejeződése a Ribavirin kezelés után 6 órával már csak 30%-a volt a kontroll mintában mért értéknek. A 9 órás mintában megfigyelt emelkedett érték is csak kevesebb mint 50%-a a kezeletlen sejtekben mért MYC mRNS kifejeződésének. A Ribavirin kezelés késői, második hatása a szer 1 napos alkalmazásától kezdve az onkogén kifejeződését 30% alá csökkentette (**17. ábra**).

4.2.2 Génexpresszió meghatározása RPA módszerrel

A kezelt K562 sejtekből származó teljes RNS mennyiségen végzett kísérlet sorozat eredményének megerősítéseként beállítottuk az RPA módszert is. Hamar nyilvánvalóvá vált ugyanis, hogy a vizsgálni kívánt markerek még ilyen relatíve kis száma esetén is szükségessé válhat egy olyan vizsgálati metodika optimalizálása, amely még nagyobb mintacsoportokban is képes számos különböző marker egymástól független, párhuzamos követésére. Erre a célra a meglehetősen nagy áteresztőképességű, viszonylag költséghatékony, 20-22 mintát és 10-12 markert egyszerre is relatíve könnyen kezelni képes RNase Protection Assay-t (RPA) alkalmaztuk.

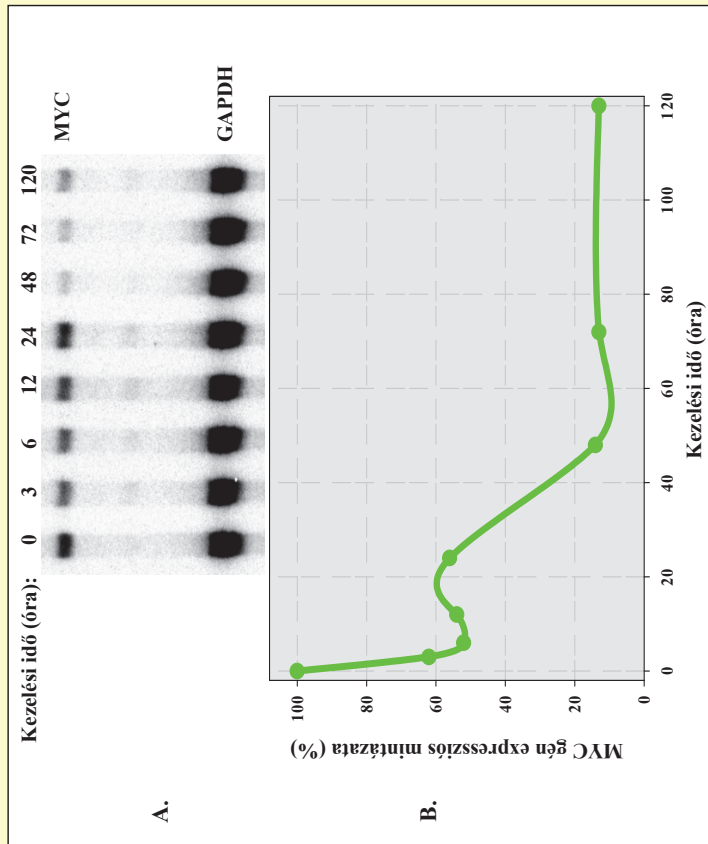


17. ábra. A MYC onkogén mRNS expressziós mintázata Ribavirinnel kezelt K562 sejtekben Northern analízissel

K562 sejteket kezeltünk 10 μ M Ribavirinnel 5 napig, majd adott időpontokban mintát véve határoztuk meg az optimalizált Northern technika segítségével a MYC onkogén génextpressziós mintázatát a GAPDH kontrollhoz viszonyítva. A Northern blotting kísérleteink során egyidőben vizsgáltuk az összes mintát az alkalmazott génekre jellemző próbakkal (A). A MYC expressziós mintázatának eredményeit denzitometriás értékelést követően ábrázoltuk (B). Az értékek három független kísérlet átlagértékei.

Ezen hibridizációs alapú technológia esetében a Northern módszernél már alkalmazott, a MYC onkogénre specifikus próbát, valamint a kontroll GAPDH rendszert használtuk. A MYC próbát tartalmazó plazmidot HindIII enzimmel, a GAPDH szekvenciát tartalmazó plazmidot pedig EcoRI restrikciós enzimmel hasítottuk, és radioaktívan jelölt RNS próbákat készítettünk in vitro transzkripció módszerével. Ezen módszer nem igényelt jelentősebb módosításokat annak érdekében, hogy a MYC gén mRNS expressziós profilját könnyebben meghatározzuk. Minden vizsgálathoz jelentős, 20 µg teljes RNS mennyiséget kellett használnunk.

Az RPA technológia segítségével a Northern hibridizációval kapott kezdeti eredményeinket sikerül megerősítenünk. A MYC onkogén mRNS szintjének erőteljes csökkenését tudtunk kimutatni, amelynek mintázata a kezelési idő függvényében változott. A kezelés hatására egy korai és egy késői választ lehetett megkülönböztetni. A korai hatás következményeként megfigyeltük, hogy a MYC mRNS mennyisége 40 %-kal csökkent a kezelés 3. órájában. A kezelés 6. órájában vett mintákban már csak 52%-a a MYC transzkripció szintje a kontroll mintában mért értéknek. A 12 órás mintákban megfigyelhető enyhe emelkedést követően a Ribavirin kezelés késői hatása a 24 órás kezeléstől kezdve az onkogén kifejeződését 20% alá csökkentette (**18. ábra**). Hasonló tendenciát figyeltünk meg, amikor 1 µM valamint 50 µM Ribavirin kezelést alkalmaztunk, ezekben az esetekben azonban csak 1-1 kezelési sorozattal történtek a vizsgálatok.



18. ábra. A MYC onkogén mRNA expressziós mintázata Ribavirinrel kezelt K562 sejtekben RPA módszerrel

10 μ M Ribavirinrel kezelt K562 sejtekben határoztuk meg RPA módszer segítségével a MYC onkogén génextpressziós mintázatait. A GAPDH kontrollhoz viszonyított MYC expressziós mintázatait mutató RPA gélekép (A) alapján denzitometriás értékelést végeztünk (B). Az értékek három független kísérlet átlagértékei.

4.2.3 Génexpresszió meghatározása, szignálútvonalak változásának követése microarray technológiával

Annak tudatában, hogy mind a Ribavirin, mind pedig az IP6 kezelés sejtszaporodást gátló hatással van K562 sejtekre, és a Ribavirin kezelés a MYC onkogén expressziójának csökkenését okozta, várható volt további, legalább a MYC kaszkáddal kapcsolatos gének expressziójának változása. A *microarray* módszert alkalmaztuk a két szerkezelésből származó RNS mintákon a teljes génexpressziós háttér előszűrő vizsgálatként. Mivel a hibridizáció alapú, akár a teljes emberi transzkriptumot reprezentáló génchipekkel való kísérletsorozatok elég nagy költséggel járnak, ezért tájékoztató jellegű mérésorozatokot végeztünk mindkét szerkezet által kiváltott génexpressziós változások meghatározására. Olyan markereket szerettünk volna azonosítani, amelyek megváltozott kifejeződése indikátorként használható az alkalmazott szerek daganatsejtek elleni esetleges későbbi használatában.

A Ribavirin korai hatásainak feltérképezésére a 15 μ M Ribavirinnel 12 óráig kezelt mintákat vizsgáltuk meg. A 15 μ M Ribavirinnel (IC_{50} ; 120 óra) végrehajtott kezelés hatására 866 gén expressziós szintje emelkedett meg, míg 830 gén mRNS mennyisége csökkent ($p < 0,05$). A génexpressziós változásokat meghatározását követően az érintett gének osztályozására a PANTHER adatbázis felosztását követtük. A nagyobb reprezentáltsági szintet elérő géncsoportokat tartalmazza a **5.** és **6. táblázat**. Ezen csoportokat tovább osztályoztuk az alábbi alapokon: a funkcionális szerep, az ismert sejtellettani útvonalakban való elhelyezkedés és az adott biológiai folyamat amelyben a funkciójukat betöltik.

Ribavirin kezelésre a K562 leukémia sejtekben legfőképpen olyan géncsoportok válaszoltak a génexpressziós szintjük változtatásával, amelyek többek között a sejtciklus szabályozásában, az apoptózisban, nukleinsav anyagcsere folyamataiban vagy a transzkripció szabályozásában szerepelnek. Nagy számú találatot azonosítottunk a WNT útvonal, a foszfadil-inozitol szignálútvonal, a MAPK kaszkád, a mitokondriális elektron transzport, oxidatív foszforiláció, a riboszómák felépítésének és a fehérjék és az aminosavak anyagcseréjének génjei közül. Magas találati arányt elért biológiai folyamatok közül kiemelendők a

sejtdhézis folyamatok, fehérjelebontás-proteaszóma folyamatok, úgymint a IKBkináz/NFKB által szabályozott túlélési kaskád is.

5. táblázat: Kis dóziszú (15 µM) Ribavirin kezelés által befolyásolt útvonalak és molekulacsoportok (példák, a PANTHER adatbázis felosztása alapján)

Útvonalak/molekula-csoportok	Emelkedő expresszió	Csökkenő expresszió
Aminosav anyagcsere	Glu, Met, Gly, Ser, Thr,Cys, Ala, Asp aminosavak anyagcsere génjei	-
Riboszóma képződés	-	A nagy és kis alegység összeszerelődéséért felelős gének
Oxidatív foszforiláció	-	NADH dehidrogenáz, cyt C oxidáz, ATP szintáz alegységek génjei
Mitokondriális útvonal (Apoptózis)	BAD, BAX, Cyt C, prokaspáz 9	-
FAS szignalizáció (Apoptózis)	FAF, FADD, Rip2, CAD-ICAD, TNFRs	CD36, JUN, MAPK14
Kaspáz útvonal (Apoptózis)	CASP6, CASP9	CASP7, CASP4
Integrin által szabályozott sejtkapcsolódási folyamatok	CAV, PXN, VCL, ZYX, RAPI	-
Proteaszómális lebontás	-	26S Proteaszóma alegységek génjei
Hisztón komplex kialakulásáért felelős gének	-	Hisztón gének (H2B, H2A, H1, stb.)
Zn-újj típusú fehérjék	KH domén fehérjék, GTP-EFTU	RAG1, RAG2, ZNF223 TFIIIA
Kemokinek/citokinek	SHC, GRB, IL2R, JAK, AKT, YARS, TRAP	IL-8

6. táblázat: 15 μ M Ribavirin kezelést követő génexpressziós változások alapján túlreprezentált útvonalak, biológiai folyamatok, molekuláris funkciók és molekuladomének (példák, a PANTHER adatbázis felosztása szerint)

Emelkedő génexpresszió	Csökkenő génexpresszió
Útvonalak	
Apoptózis	MAPK szignalizáció
WNT útvonal	Foszfatidil-inozitol szignalizáció
Biológiai folyamatok	
Apoptózis indukció	Apoptózis inhibíció
Nukleotid és nukleinsav anyagsere	Transzkripció szabályozás és riboszóma összeszerelődés
Sejtdhézio	Elektrontranszport
Aminosav anyagsere	Lipid anyagsere
Sejthalál	Fehérje bioszintézis
Sejtciklus szabályozás	RNS, mRNS anyagsere
IKB kináz/NF κ B szabályozás	Proteasómális lebontás
Molekuláris funkció/molekuladomének	
Zn-újj típusú fehérjék	Riboszomális fehérjék, transláció
mRNS kötés	RNS felismerésért felelős motívumok
Egy- és kettősszálú DNS kötő motívumok	Purin nukleotid kötő motívumok
Aktin kötő domén	PI3K és PI4K domének
Transzlációs iniciációs faktorok	ABC transzporterek

Ezt követően kiválasztottunk az apoptózis és a MAPK útvonalak azon génjeit, amelyek mRNS szinten a Ribavirin kezelést követően változást mutattak. A PANTHER, David és a GeneMapp szoftverek segítségével csoportosítottuk a géneket és elemeztük génexpressziós változásait.

Az apoptózis folyamatában szerepet játszó gének közül a BAD pro-apoptotikus gént inaktíváló PI3K és AKT/PKB gének expressziós csökkenést mutattak Ribavirin kezelést követően. A mitokondrium által közvetített apoptózis egyik kulcsgénje, az anti-apoptotikus aktivitású BCL2 szintjében csökkenést tapasztaltunk, emellett a BCL2 gént gátló BAX gén expressziója emelkedett a kezelés hatására, hasonlóan a vizsgált kaszpázok és társmolekuláinak mRNS szintjéhez (CASP6, CASP7, CASP9, FADD, IRAK). A pro- és anti-apoptotikus gének expressziós szintjének összesített változásai a Ribavirin kezeléseknél apoptózist indukáló hatását erősítik meg.

A mitogén-aktivált protein kináz (MAPK), mint a legismertebb jelátviteli útvonal génjeinek mRNS szintjén bekövetkező változásait is vizsgáltuk. A klasszikus MAPK útvonal, azaz a RAS/RAF kaszkád génjei (RAS, RAF, MEK1, MEK2) mRNS szintjükben csökkenést mutattak, ezzel egyidejűleg a sejtszaporodás szabályozásában (CREB, JUN, MYC) szereplő kulcsgének expressziójában is ugyanilyen csökkenést tapasztaltunk. Jelentősen aktiválódott vagy csökkentett mRNS szintekkel rendelkező géneket tartalmazza a **2. melléklet**.

Ribavirinnel végzett kísérleteinkkel párhuzamosan az IP6 kezeléseket is elvégeztük K562 sejteken. 750 μ M IP6-tal (IC_{50} ; 120 óra) kezeltünk rövidebb ideig (30 és 60 perc) és 5 mM-os oldatot alkalmaztunk (IC_{50} ; 24 óra) az IP6 késői hatásainak (12 órás kezelés) feltérképezésére (**3. melléklet**).

750 μ M IP6-tal való kezelés hatására fél órát követően nem tapasztaltunk jellegzetes génexpressziós változásokat. Hasonlóan, nem szignifikáns változásokat tapasztaltunk 60 perc kezelést követően a kis dózis alkalmazásával, és ezek főleg a gyulladásos folyamatok génjeiben valamint a sejtproliferációt szabályozó gének gátlásában mutatkoztak meg. 771 gén expressziós növekedését és 1041 gén mRNS szintjének csökkenését tapasztaltuk az 1 órás IP6 kezelés után K562 sejteken.

Az 5mM IP6 oldattal 12 óráig kezelt K562 sejteken 1243 transzkript változását tapasztaltuk, amelyből 615 növekedett és 628 csökkent. A **8. táblázat**

foglalja össze a legjelentősebb biológiai folyamatokat és útvonalakat, amelyek választottak leukémia sejtekben az IP6 kezelést követően.

8. táblázat: IP6 kezelés által befolyásolt útvonalak és biológiai folyamatok (példák, a PANTHER adatbázis felosztása alapján)

IP6 kezelés által befolyásolt útvonalak/biológiai folyamatok	
(750 μ M 60 perc)	(5 mM 12 óra)
PI3 kináz útvonal	PI3 kináz útvonal
Insulin-IGF útvonal	EGF és FGF útvonal
Wnt útvonal	Wnt útvonal
TGF- β útvonal	JAK/STAT útvonal
Onkogének	Onkogének
Transzkripció	Immunválasz, gyulladásí folyamatok
Fehérje bioszintézis	Apoptózis, Angiogenezis

Mindkét IP6 koncentráció kiváltotta a génexpresszió csökkenését a hiszton gének és a DNS replikáció gének között, úgymint az ismert onkogének (MYC, CDK4, ELK1, E2F1, JUN, K-RAS, N-RAS), a WNT szignálútvonal (CDH13, FZD5, PLCB3) és a sejtprolifерációt szabályozó útvonalak (inzulin-IGF, PI3K útvonal) génjei között. Kevés, az apoptózishoz köthető gén mRNA szintű változását sikerült kimutatnunk (NFKBIA, ATF4, DAXX, AMID). Megnövekedett expressziós szintet mutattak azonban az immunválasz specifikus kemokinjei (CXCL1, CXCL2, CKLFSF3, CD69), citokinjei (IL8, IL23A, IL27RA2) és egyéb génjei is (IER3, NFATC1, IER5, PILRB), amelyek a T és B sejtés immunválasz kialakításáért felelősek. Az 5 mM-os kezeléssel az angiogenezisben ismert gének expressziójának csökkenését tudtuk kimutatni (LYN, WNT10A, PXN, DVL1), azonban a korai időpontokban egyik koncentrációval sem tapasztaltunk olyan expressziós

változásokat, amelyek az eritroid irányú differenciáció felé mutatnak (nem közölt adatok). Vizsgálataink eredményeképpen, a különböző csoportokba tartozó génexpressziós változásokat a **3. melléklet** foglalja össze. Összességében elmondható, hogy az IP6 kezelést követően a leukémia sejtek szaporodása csökkent és ezen gátló hatás mRNS szintű expressziós hátterét ismerhettük meg.

Figyelembe véve a tényt, hogy ezen hibridizáció alapú módszernél érzékenyebb és pontosabb a valós-idejű kvantitatív PCR, ezért *microarray* kísérleteinket mint előszűrést alkalmazva, vizsgálataink következő fázisaiban célirányosan kiválasztott gének expressziós szintjének meghatározására törekedtünk.

4.2.4 Génexpresszió meghatározása kvantitatív valós-idejű PCR reakcióval

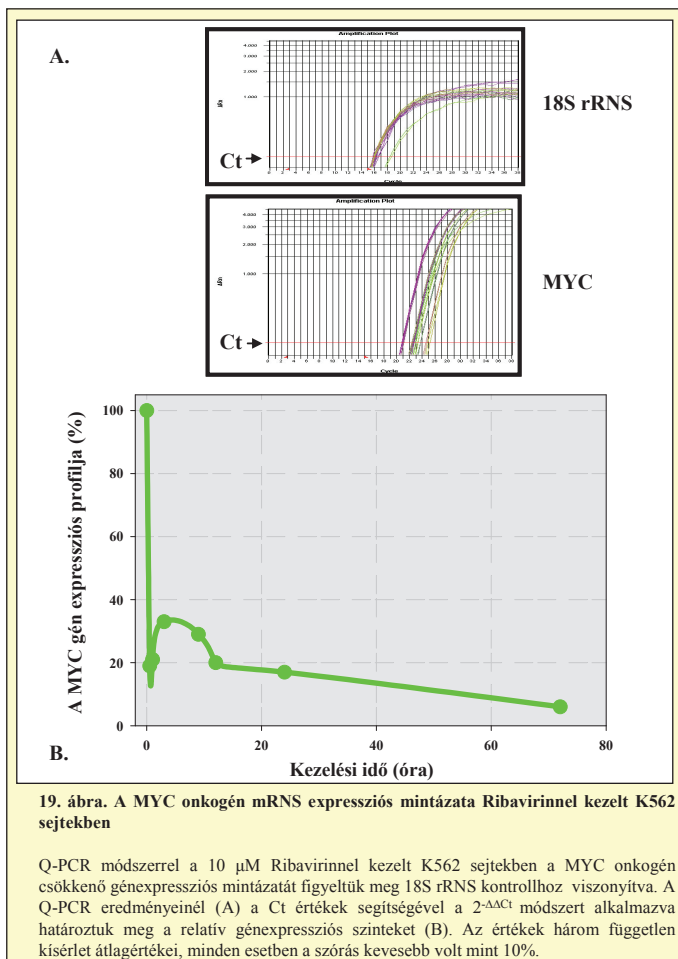
4.2.4.1 A MYC onkogén expressziójának meghatározása Ribavirinnel kezelt K562 leukémia sejtekből izolált mintákon

Az előző fejezetekben tárgyalt Northern blotting, RPA és *microarray* ugyan alkalmazható módszerek a génexpresszió meghatározására, vizsgálataink legnagyobb részében azonban a kevesebb kiindulási anyagból nagyságrendekkel pontosabb, egyszerűbb, gyorsabb és érzékenyebb módszerrel, a kvantitatív valós-idejű PCR-rel dolgoztunk.

A Northern analízishez valamint az RPA módszerhez használt feltételeket részben követve (10 μ M koncentrációjú Ribavirinnel kezelt K562 sejtek; különböző időpontokban vett minták) vizsgáltuk a MYC onkogén mRNS szintű kifejeződésének mintázatát.

A vizsgálatok során a 18S rRNS gént használtuk kontrollként, az expressziós értékek minden esetben a kontroll mintában megfigyelt, referenciaként tekintett MYC expresszióra vonatkoztatott relatív transzkripciós szintet jelentik.

A kezelés eredményeként – hasonlóan korábbi eredményeinkhez – egy korai, és egy késői választ tudtunk detektálni. A korai hatás azonban karakterisztikusabbnak tűnt, hiszen már az 1 órás kezelés is 78%-os csökkenést okoz a MYC mRNS szintjén. Ezt követően az onkogén kifejeződése a Ribavirin kezelés után 6 órával már csak 20%-a volt a kontroll mintában mért értéknek.



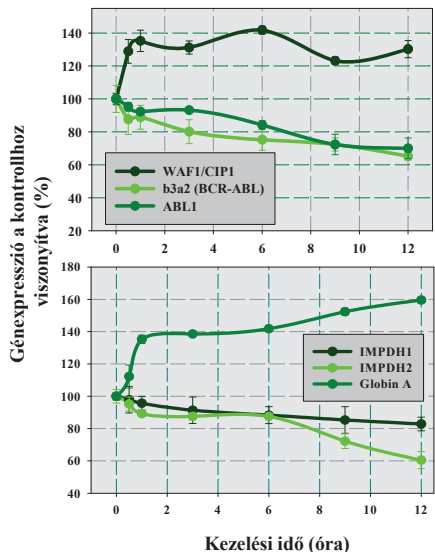
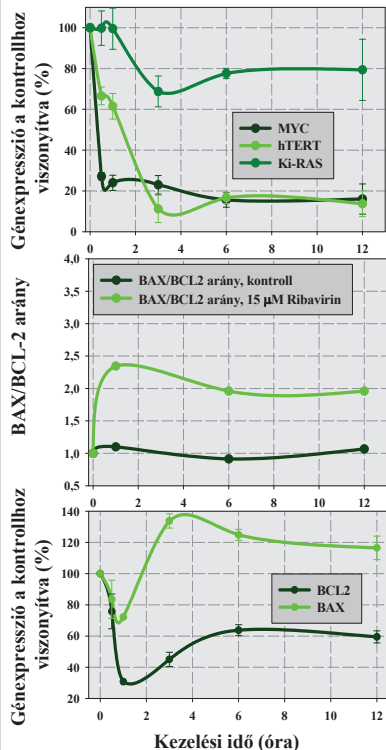
Ellentétben a korábbi eredményekkel, ezzel a módszerrel már a 3 órás mintában megfigyelt hirtelen emelkedés is csak kevesebb mint 50%-a volt a kiindulási kezeletlen sejtekben mért MYC mRNA kifejeződésének. Jelentősnek ítéljük a Ribavirin kezelés késői hatását (a 24 és 72 órás mintákban), ahol az onkogén kifejeződését a szerkezelés 20% alá csökkentette (**19. ábra**).

4.2.4.2 A kis dózisu Ribavirin kezelés hatékonyságának vizsgálata, a sejtélettani hatások és a microarray eredmények validálása

Előkísérleteinket követően kiterjesztettük a Q-PCR-rel történő kísérleteinket annak érdekében, hogy a Ribavirin kezelésekre hatására bekövetkező génexpressziós változásokat közvetlen vizsgálhassuk, illetve a sejtélettani jelenségeket és a *microarray* adatokat validálhassuk. Ezért kiválasztottunk 10 olyan gént, amelyek a sejtproliferáció, PI3K útvonal, apoptózis és a differenciáció szempontjából kulcsfontosságúak. Ezeket a 30 perces kezeléstől 12 óráig bezárólag, 15 μ M Ribavirinnel kezelt és nem kezelt K562 sejtekben vizsgáltuk. Q-PCR technikával azonosítani tudtuk a MYC onkogén gyors – fél órát követően, 25%-ra a kezeletlen mintákhoz képest – expressziós csökkenését. Hasonló jeleket tapasztaltunk a 3 órás mintában a TERT (18%-ra) és 3 órán belül a Ki-RAS (68%-ra) gének esetében is **(20. ábra)**.

A Ribavirin apoptózist indukáló képességére utaló génkifejeződés változásokat azonosítottuk Q-PCR módszerrel, amelynek során a BAX/BCL-2 gének mRNS arányát határoztuk meg. Az apoptotizáló sejtszám növekedésének megfelelően a BCL-2 mRNS expressziója 60%-ra csökkent a kezeléstől számított 6. órában, míg a BAX 124%-ra emelkedett, és a két gén expressziós aránya a kontrollgénekhez viszonyítva pedig közel 2,5-szeres emelkedést mutatott. Az eritroid differenciáció markereként ismert globin-A gén mRNS szintű expressziójának emelkedését is tapasztaltuk (160% a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva) **(20. ábra)**.

A CIP1/WAF1 gén mRNS szintje szignifikáns emelkedést (130-140%) mutatott, ugyanakkor a Ribavirin célenzimének két izoformája a kezelés 12. órájában 60% (IMPDH II) és 80% (IMPDH I) expressziós szintre csökkent. Továbbá sikerült a b3a2 transzkript – a BCR/ABL fúziós gén legfontosabb mRNS variánsa – és az ABL onkogén mRNS expresszióját 65%-ra csökkenteni 12 órás Ribavirin kezelést követően **(20. ábra)**.



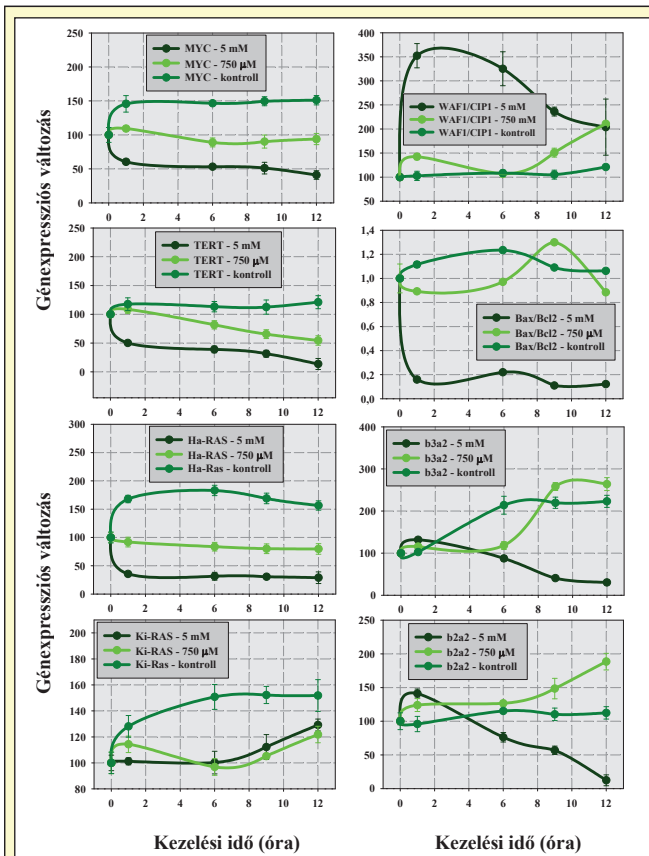
20. Microarray adatok validálása (15 μ M Ribavirin, 0,5-12óra)

Q-PCR kísérleteink eredményeként csökkenő génexpressziós mintázatot azonosítottunk a MYC, hTERT, Ki-RAS, IMP DH1, IMP DH2 és BCL2 géneknél, valamint az ABL1 és a leukémia markerként ismert BCR-ABL fúziós gén fő transzkriptváriánsánál, a b3a2-nél. Kis dózisú Ribavirin kezelés hatására a K562 sejtekben emelkedett a globin A és WAF1/CIP1 és a BAX gének mRNS szintje, valamint az apoptózis azonosítására alkalmas BAX/BCL2 mRNS szint hanyadása. Az értékek három független kísérlet átlagértékei az RPLP0 és a β 2-mikroglobulin belső kontrollokhoz viszonyítva.

4.2.4.3 Az IP6 kezelés hatékonyságának vizsgálata, a sejttéltani hatások és a microarray eredmények validálása

A Ribavirinrel végzett vizsgálatainknak megfelelően, a *microarray* előszűrés alapján végeztük el az eredmények megerősítését és az expressziós mintázat meghatározását az IP6-tal történt kezelések esetében is. A MYC, TERT, Ha-RAS és a Ki-RAS gének expressziója csökkent, a sejtprolifерáció gátlásáért felelős CIP1/WAF1 transzkripciós szintje pedig emelkedett az IP6 kezelés hatására. A MYC esetében csak a nagy dózis (5 mM) csökkentette felére – már a kezelést követő 1 órán belül – az mRNS szintet, míg a 750 μ M hatástalannak bizonyult. A TERT expresszió 1 óránál már 50%-kal, míg 12 óránál 10%-ra csökkent a kiindulási szinthez képest 5 mM IP6 hatására. Ugyanezen gén kifejeződése a kis dózisú kezelés esetében csak 12 óránál érte el a kezdeti szint felét. A Ha-RAS szintje a kontroll mintákban közel másfélszeresére nőtt 6 óra alatt, 5 mM IP6-tal a génexpressziós szint a 30% körüli értékre esett le az 1 órás kontrollhoz viszonyítva, míg a kis koncentrációjú IP6 hatástalannak bizonyult. A WAF1/CIP1 gén mRNS mennyisége a kontroll, 1 órás mintához képest közel 3,5-szörösére nőtt ugyanebben az időben 5 mM IP6 kezelés után. A kis koncentrációjú IP6-nak nem volt hatása ezen gén kifejeződésére **(21. ábra)**.

Vizsgálataink során nemcsak sejttani szinten nem voltak érzékelhető jelei az apoptózisnak, hanem bármelyik IP6 koncentrációt alkalmazva sem tapasztaltunk emelkedést a BAX/BCL-2 arányban. Ebben az esetben is megvizsgáltuk a BCR/ABL fúziós gént, és kimutattuk, hogy a nagy dózisú IP6 kezelés képes csökkenteni mindkét (b3a2 és a b2a2) mRNS expressziós szintjét. A b2a2 expresszió esetében korai emelkedést követően az 5 mM IP6 12 óránál a kiindulási szint 10%-ára csökkent. Szintén korai emelkedés után, a b3a2 mRNS szintje a 6 órás mintában a kontroll fele, míg 12 óránál a kontroll negyede volt 5 mM IP6-ot adva a sejtekhez **(21. ábra)**.



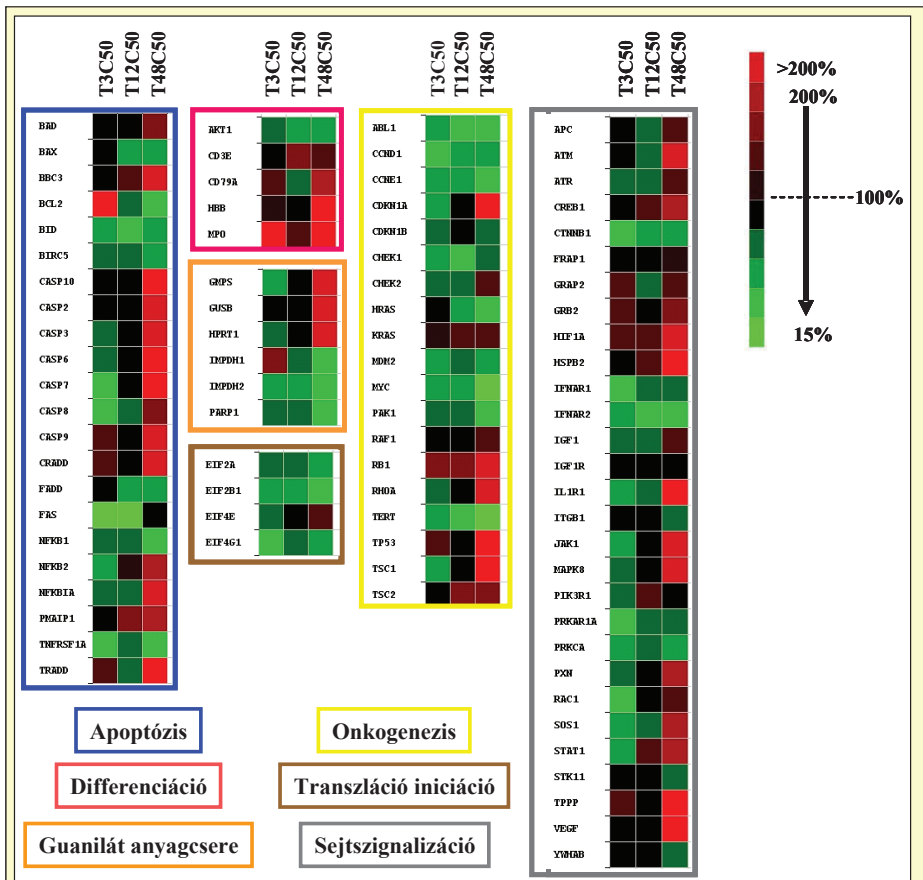
21. ábra. Microarray adatok validálása (750 μ M és 5 mM IP6, 1-12 óra)

Q-PCR kísérleteink eredményeként csökkenő génexpressziós mintázatot azonosítottunk a MYC, TERT, Ha-RAS és Ki-RAS, valamint a leukémia markerként ismert BCR-ABL fúziós gén fő transzkriptvariánsainál, a b3a2-nél és a b2a2-nél. A p21 fehérjét kódoló WAF1/CIP1 gén mRNAs szintje emelkedett az IP6 kezelést követően. Az apoptózis azonosítására alkalmas BAX/BCL2 arány vizsgálatánál nem találtunk jelentős apoptotikus hatásra utaló mintázatot. Az értékek három független kísérlet átlagértékei az RPLP0 és a β 2-mikroglobulin belső kontrollokhoz viszonyítva.

4.2.4.4 *Taqman kis-denzitású génexpressziós array (TLDA) kísérletek a nagy dózisú Ribavirin kezelés és a sejtleletani hatások hatékonyságának meghatározására*

Ribavirin kezelések (0-48 óráig) esetében is az előre kiválasztott géncsoportok további elemzését végeztük annak megismerésére, hogy a nagy dózisú (50 μ M) kezelések által kiváltott sejtteni hatások mellett a daganatgenetikai szempontból fontos gének expressziója milyen irányba és mennyire változnak. A TLDA kártyák 384 mintahelyére azon 96 gén került a PANTHER adatbázis alapján, amelyek daganatgenetikai szempontból az apoptózis, a differenciáció, a transláció iniciáció valamint a guanilat anyagcseréhez köthetők (**1. melléklet**). A kiválasztott gének között onkogének, tumorsuppresszor gének és egyéb, a főbb szignalizációs útvonalakhoz kapcsolódó géneket választottuk ki. A génspecifikus real-time PCR *assay*-k segítségével akár 0,5 ng mennyiségű mRNS-t – illetve abból átirít cDNS-t – lehet vizsgálni génenként 1 μ l végtérfogatban, sztenderd körülmények között minimális idő- és munkaráfordítással. Az eredmények kiértékelése során 2 belső kontroll gén expressziós mediánjához mérten tudtuk az erre kifejlesztett Statminer szoftverrel az összesen 3840 értéket egyszerre kezelni. A nyers eredmények első analízisét követően a gének expressziós eredményeit külön-külön, csoportanalízisnek vetettük alá, annak érdekében, hogy megtudjuk az együtt változó gének irányultságát a kezelés teljes időtartama alatt (**22. ábra**).

A citológiai módszerekkel már bizonyított apoptózis és eritroid differenciáció génjeinek vizsgálata során azonosítottuk, hogy a pro-apototikus folyamatokban szereplő gének mRNS szintje csökkent (BAX, BID, BIRC5, FADD, TNFRSF1A, FAS), míg az ugyanebbe a csoportba tartozó BAD, BBC3 és PMAPI gének expressziója megemelkedett minden vizsgált időpontban a 48 óráig tartó kezelés során. Az apoptózis gének közül jellemző mintázatot azonosítottunk a kaszpáz-gének, az NFKB2 és NFKBIA gének mRNS szintjének változásában, hiszen a kezelés 3. órájában csökkenést, majd 48 óránál emelkedést tapasztaltunk. A pro- és anti-apototikus gének összesített génexpressziós irányultsága egyértelműen jelezte, hogy a nagy dózisú Ribavirin kezelések a kaszpázok aktivációján keresztül és a mitokondriális citokróm-c felszabadulás útján serkentik az apoptotikus folyamatokat leukemia sejtekben (**22. ábra, 4. melléklet**).



22. ábra. Génexpressziós profilja biológiai szerepük alapján csoportosítva

Az expressziós mintázat meghatározását végeztük 50 μ M Ribavirinrel kezelt K562 sejtekből. A TLDA analízis eredményeinek felhasználásával a 6 nagyobb funkcionális csoportba tartozó 85 gén kifejeződését ábrázoltuk. Minden egyes gén expressziós változását a színes négyzetek jelölik, zölddel a csökkenést, míg pirossal az emelkedett expressziót ábrázoltuk az idő (T3, T12, T48) jelentik a 3, 12 és 48 órás kezeléseket és a kezelési dózis (C50 az 50 μ M-os kezelés) függvényében. Az értékek átlagértékek az RPLP0 és a β 2-mikroglobulin belső kontrollok arányaihoz valamint a kezeltetlen kontrollhoz viszonyítva; SE < 10%.

A Ribavirin kezelések hatására a β -globin (HBB) gén expressziója több mint kétszeresére emelkedett. Ezt alátámasztva azon gének is aktiválódtak, amelyek szintén a differenciáció serkentésében szerepelnek (CD79A és az MPO). Ezzel egyidejűleg az anti-differenciációs faktorként is ismert AKT1 gén mRNS szintjének jellegzetes csökkenését tapasztaltuk, tehát összességében bebizonyítottuk, hogy a nagy koncentrációjú Ribavirin – génexpressziós moduláció segítségével is – képes eritroid differenciációt indukálni K562 sejtekben **(22. ábra, 4. melléklet)**.

A purin/guanilát anyagcsere és a transzláció iniciáció csoportjába tartozó gének döntő többsége expressziós csökkenést mutatott Ribavirin kezelés hatására. Első alkalommal sikerült azonosítanunk, hogy a K562 leukémia sejtekben elsődlegesen aktív IMPDH II mRNS szintje szignifikánsan csökkent az 50 μ M-os kezelést követően. Korai emelkedés után, a kezelés 12. és 48. órájában az IMPDH I kifejeződése is a kiindulási értékek közel a felére csökkent. Hasonló expressziócsökkenés volt tapasztalható a purin anyagcserében központi szerepet betöltő PARP1 enzim génjének expressziójában is **(22. ábra, 4. melléklet)**. Ezek a hatások már a kezelés megkezdésétől számított korai időpontokban is érzékelhetőek voltak, és a késői időpontban sem változtak. A Ribavirin által kiváltott transzlációs gátlás vizsgálata során sikerült azonosítanunk, hogy az EIF2A és EIF2B génexpressziós csökkenése mellett az EIF4G1 gén mRNS szintje is a felére csökkent. A GMPS, GUSB, HPRT1 és EIF4E gének mRNS szintje korai csökkenést követően a kezelés későbbi időpontjaiban emelkedést mutattak **(22. ábra, 4. melléklet)**.

Mind az onkogenezis csoportba, mind pedig a sejtciklus szabályozás kategóriába tartozó gének esetében sikerült bizonyítanunk, hogy az ABL1, CCND1, CCNE1, CDKN1B, HRAS, MDM2, MYC, PAK1, TERT gének expressziója minimum a felére csökkent a nem kezelt kontroll mintákhoz viszonyítva **(22. ábra, 4. melléklet)**. A klasszikus tumorsuppresszorok közül a TP53, RB1 és a TSC2 gének mRNS szintje minimum 50%-kal emelkedett a nagy dózisú Ribavirin kezelést követően. Génexpressziós emelkedést mutattak továbbá a HIF1A1, HSPB2, TPPP és VEGF gének a kezelés összes időpontjában, míg a CTNNB1, IFNAR1/2 gének, protein kinázok (PRKARIA, PRKCA) szintje jelentősen csökkent ugyanezen feltételek mellett **(22. ábra, 4. melléklet)**. Korai (3 óra) csökkenést és késői (48 óra)

emelkedést tapasztaltunk az IGF1, IL1R1, JAK1, PXN, SOS1 és STAT1 gének mRNS szintjének tanulmányozásakor.

Kísérleteink utolsó részében idő-független génexpressziós értékeket számoltunk összesítve a rendelkezésünkre álló adatokat annak érdekében, hogy megtudjuk az 50 μ M-os Ribavirin kezelés által kiváltott génszintű expressziós választ. Ezen eredményeinket foglalja össze a **4. melléklet**.

Összességében bizonyítottuk, hogy a Ribavirin kezelés képes a leukémia sejtek szaporodásának gátlására, és az apoptózis és a differenciáció serkentés mellett több útvonalon is képes a daganatokkal kapcsolatos folyamatok modulálására; ezt első alkalommal sikerült génexpressziós szinten is azonosítanunk.

5 AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A diagnosztikai és prognosztikai célú felhasználás mellett a genomikus profilvizsgálatok gyógyszerfejlesztésre, a gyógyszerérzékenység és rezisztencia profiljának meghatározására is felhasználhatók. A jelenleg alkalmazott rákterápiás megközelítések nagyrészt általános célpontok ellen irányulnak. A jövőbeli terápiás megközelítések esetén elképzelhető, hogy – a molekuláris célpontok azonosítása valamint a rákgén-funkciók tisztázása által – specifikusabban támadhatóak lesznek majd a jelátviteli utak csomópontjai is. Ilyen megközelítéssel – legalábbis elméletben – kisebb gyógyszeradagokkal nagyobb hatékonyság és kevesebb toxikus mellékhatás érhető el (Oláh, 2007). A daganatkutatás folyamatosan szolgáltatja azokat az ismereteket, amelyre a diagnosztika és terápia megújulása építhető. Az új eredmények folyamatosan módosítják a biológiai vagy klinikai téziseket, azonban az alapvető kérdés mégis az, hogy ezek a kutatási eredmények mennyiben tudnak a klinikumban hasznosulni. Tekintetbe véve azonban azon enziminhibitorokat és természetes molekulákat is, amelyek megfelelő módon és specifitással képesek hatásukat kifejteni a daganatsejtekben aberránsan aktiválódott szignálút vonalak és anabolikus pályák gátlására, ezek egyedüli vagy kombinációs alkalmazásával végeredményképpen a daganatsejtek „Achilles-ínát” célozhatjuk meg (Kroemer és Pouyssegur, 2008).

5.1 Sejtélettani vizsgálatok: a Ribavirin és az IP6 kezelés hatása daganatsejteken

5.1.1 A Ribavirin kezelés

A daganatos fenotípus kialakításáért felelős többlépcsős transzformációs folyamat alapvető konzekvenciája a rákos sejtek anyagcserefolyamatainak megváltozása. Ezen belül ismert a guanilát anyagcsere szintetikus lépéseinek az aktiválódása, döntő többségében a GTP szintéziséért felelős IMPDH enzim túlzott

működésének köszönhetően. A Roland Robins kémikus által szintetizáltatott nukleozid analógok között volt az IMPDH enzim gátlásáért felelős Ribavirin és Tiazofurin molekula is. Mivel az IMPDH enzim gátlásának következményeként az aberránsan proliferáló daganatsejtek pusztulását lehetett előidézni, ezért érdekes megközelítésnek tűnt ezen analógok vizsgálata, esetleges későbbi kemoterápiás alkalmazás céljából (Weber, 1983; Kroemer és Pouyssegur, 2008).

Jelenlegi munkánk során sikerült megerősíteni, hogy a vírusellenes hatásáról már jól ismert Ribavirin egyedüli alkalmazásával gátolja daganatsejtek szaporodását. Citotoxikus hatást tudtunk azonosítani emlőtumor (MCF-7), petefészek daganat (OVCAR-5), hepatocelluláris karcinóma (HepG2) és krónikus mieloid leukémia (K562) sejteken és ezek a kezelési idő valamint az alkalmazott szerkoncentráció növelésével jellegzetesebbé váltak. A kezelés hatására – a későbbi molekuláris vizsgálatainkhoz kiválasztott – K562 leukémia sejtek szaporodása erősen lecsökkent. A vártan megfelelően, magasabb koncentrációk alkalmazásával (például 50 μM vagy 150 μM) erősebb gátló hatást tapasztaltunk a K562 sejtek szaporodásában. Eredményeinket támogatják mások előzetes eredményei (Joksic és mtsai, 2000), másrészt ismereteink szerint leukémia sejtvonalon ezt ez idáig még senki sem igazolta.

Vizsgálataink során megerősítést nyert, hogy ezeket a sejtélettani változásokat részben a programozott sejthalál folyamatához köthetjük, és az alkalmazott dózissal és a kezelés idejével emelkedik az apoptotizáló sejtek száma. Jelentős, majdnem 50%-os apoptotikus arányt mutattunk ki 10 és 50 μM Ribavirin hatására a kezelés kezdetétől számított két napon belül. A túlélési értékek is megerősítik a tényt, hogy a Ribavirin egy hatásos sejtosztódást gátló szer K562 humán krónikus mieloid leukémia sejtekben, és ennek hátterében az apoptotikus indukció látszik a fő mechanizmusnak. Ezzel sikerült bebizonyítanunk, hogy az IMPDH specifikus inhibitoraként a Ribavirin nemcsak a Tiazofurinnal, vagy quercetinrel szinergista módon képes programozott sejthalált indukálni a *de novo* GTP szint csökkentésén keresztül (Natsumeda és mtsai, 1988; Li és mtsai, 1999). Összességében világossá vált, hogy a Ribavirin egyedüli szerként alkalmazva is képes programozott sejthalált indukálni K562 sejtekben.

Későbbi vizsgálataink során azonosítottuk, hogy a MYC onkogén expressziójának csökkenése a Ribavirin kezelés következménye. Tudtuk azt is, hogy a MYC túlzott kifejeződése gátolja a p53 proapoptotikus aktivitását K562 sejtekben (Ceballos és mtsai, 2000).

Az eritroid differenciáció kialakításában is szerepet tulajdoníthatunk a Ribavirin kezelésnek. Kísérleteink eredményeként sikerült azonosítanunk a Ribavirinnel kezelt K562 sejtek eritroid differenciációs mintázatának emelkedését, amely az alkalmazott szer koncentrációjának növelésével összefüggést mutat. Kifejezett differenciáció indukció azonban csak a nagyobb alkalmazott szerkoncentrációval (50 μ M és 150 μ M) érhető el. Ezen eredményeink újdonságát alátámasztják a mások által már tapasztaltak, és jól tükrözik azt a tényt is, hogy az IMPDH gátlásából adódó redukált GTP szint mellett a Ribavirin számos jelátvivő útvonal működését befolyásolja (Li és mtsai, 1999).

5.1.2 Az IP6 kezelés

A lehetséges daganatterápiás hatóanyagkénti vizsgálataink tekintetében értéeltük a természetben előforduló IP6 tesztelését leukémia sejteken. Mivel az IP6 és inozitol kombináció eredményes adjuvánsként kiegészíti a hagyományos kemoterápiás szerek hatásait (Lee és mtsai, 2005; Roy és mtsai, 2009), ezért munkánk során igyekeztünk minél pontosabb képet kapni arról, hogy az IP6 egyedüli szerként milyen hatással lehet a leukémia sejtek transzkriptomjára. Végsőként olyan biomarkerek és útvonalak azonosítását tekintettük, amelyek működésének gátlása akár a gyógyászat területén is alkalmazást nyerhet akár már használatos ágensek kombinálásával.

Vizsgálatainkkal mi is igazoltuk, hogy az IP6 – mint a természetben is előforduló, növényi szövetekben, magvakban megtalálható polifoszforilált szénhidrát molekula – képes a K562 leukémia sejtek szaporodását gátolni. Eredményeinkkel bizonyítottuk továbbá azt az elképzelést, miszerint a szer alkalmazási idejének és koncentrációjának növelésével a citotoxikus hatás erősödik. Figyelembe véve azonban az irodalomban eddig közölt eredményeket, kezeléseink során nem alkalmaztunk 5 mM-nál magasabb koncentrációt, mert az ennél

magasabb dózis már a egészséges sejtekre is erős citotoxikus hatással van (Nickel és Belury, 1999).

Jelen esetben is felvetődött az a kérdés, hogy az IP6 kezelés által kiváltott sejtpusztulás kapcsolatba hozható-e az apoptózissal. Vizsgálataink alapján bebizonyosodott azonban, hogy az IP6 sejtpusztító hatása mellett nem tapasztalhatóak az apoptózis jellegzetes morfológiai jelei. Az irodalomban ismert munkák alapján azonban kiderült, hogy az IP6 serkenti a WAF-1/CIP1 gén expresszióját, ezen keresztül pedig a p53 által közvetített sejtproliferáció gátlást is. Ezen hatások mellett – ellentétben az általunk leukémia sejteken tapasztaltakkal – az apoptotikus markergének, mint például a kaszpáz-3 aktiválódása is kimutatható volt a prosztata sejtek programozott sejthalálának beindítása során (Saied és Shamsuddin, 1998; Singh és mtsai, 2003).

A Ribavirinhez hasonló kísérleti elrendezésnek megfelelően a nagyobb, azaz 5 mM-os IP6 kezelés hatszoros emelkedést váltott ki az eritroid differenciációt mutató benzidin pozitív K562 sejtek arányában a kontroll mintákhoz képest. A szakirodalomban ma már nagyon sok közleménnyel van összhangban azon állításunk, miszerint az IP6 kezelés hatására daganatsejtek differenciációra való hajlama megemelkedik; azonban eredményeink abból a szempontból is figyelemre méltóak, hogy ismereteink szerint elsőként munkacsoportunknak sikerült feltárni a sejtdifferenciálódás globális genom szintű változásait a génexpresszió eszközeivel (Shamsuddin és Yang, 1995; Tantivejkul és mtsai, 2003; Vucenik és Shamsuddin, 2003; Bozsik és mtsai, 2007).

A daganatok vizsgálata során a ráksejtekben a normál sejtekhez képest megváltozott génexpressziós mintázatokat tapasztalunk. Ezek jó alapul szolgálhatnak a kemoterápiás megközelítésekhez, valamint a kezelések hatékonyságának teszteléséhez. Ezen tények figyelembevételére alapján indultunk el a tapasztalt hatások hátterében húzódó molekuláris mechanizmusok feltérképezésének útján, azaz a Ribavirin és az IP6 kezelések által indukált génexpressziós változások és a jellemző útvonalak meghatározásának irányába.

5.2 Génexpressziós profilmeghatározások

5.2.1 Az alkalmazott génexpressziós módszerek áttekintése

A daganatkutatás kulcslépése és legnagyobb kihívása is egyben azon biomarkerek – gének, útvonalak, jellegzetes mintázatok – feltérképezése, amelyek a betegség korai felismerését, a betegség prognosztizálását és az alkalmazott terápia megtervezését, monitorizálását a lehető legkíméletesebb módon lehetővé teszik. A biomarkerek meghatározása adja a kezünkbe azt a lehetőséget, hogy a beteg kezelését (prognosztikus biomarker) és/vagy a terápia hatékonyságát is (prediktív biomarker) egyszerre vizsgálhassuk (van't Veer és Bernards, 2008). A génexpressziós profilok meghatározása, az adott molekuláris aláírások (*gene expression signature*) megfejtése állt munkánk középpontjában, amikor a K562 leukémia sejtvonalat Ribavirinnel és IP6-tal kezeltük.

Vizsgálataink sorrendjéből adódóan a Northern blotting technológia után az RPA módszerrel határoztuk meg a MYC onkogén kifejeződését kis dózisú Ribavirin kezelés hatására, majd a Q-PCR módszer beállítását követően validáltuk ezzel a technológiával is korábbi eredményeinket. Az IP6 és a Ribavirin kezelések teljeskörű transzkriptomikai válaszának előszűrése *microarray* technológiával történt, amelyből a kiválasztott gének expressziós profilját szintén Q-PCR-rel erősítettük meg. Sok esetben az *array*-eken tapasztalható nem szignifikáns változásokat sikerült megerősítenünk az érzékenyebb és pontosabb Q-PCR módszerrel is, és ez abból a szempontból is megerősített eredménynek tekinthető, hogy az *array*-en levő próbák és az alkalmazott Taqman-alapú génexpressziós próbák az adott génnek nem ugyanarra a szakaszára voltak tervezve. A TLDA (Taqman alapú kis denzitású génexpressziós *array*) módszer tűnt a legalkalmasabbnak arra, hogy a kiválasztott és a daganatgenetikai szempontból érdekesnek tűnő géneket egyszerre, egy futásban is detektálhassunk valós-idejű kvantitatív PCR-rel. Ez a technika, amely alkalmas akár 384 gén expressziójának vizsgálatára is, különösen hatékony az *array*-eken mért génexpressziós változások nagy teljesítményű, gyors és költséghatékony megerősítésére, mindazonáltal teljesen flexibilisen vagy előre összeállított géncsoportok célzott expressziós vizsgálatára is. Az általunk génexpresszió meghatározására alkalmazott metodikák legfontosabb

tulajdonságait a **11. táblázatban**, ezen jellemzőikből, a használat során szerzett tapasztalatainkat és az ezekből megállapított előnyeiket/hátrányaitak pedig a **12. táblázatban** foglaltuk össze.

11. táblázat: A génexpressziós vizsgálatokra alkalmazott módszereink áttekintése

	<i>Northern blotting</i>	<i>RPA</i>	<i>Microarray</i>	<i>Q-PCR</i>	<i>TLDA</i>
Technológiai alap	Hibridizáció	Hibridizáció	Hibridizáció	Polimerizáció/ Hibridizáció	Polimerizáció/ Hibridizáció
Próbaszekvenciák száma/vizsgálat	1-2	10-12	> 41.000 transzkript	> 700.000 transzkript, variáns	> 700.000 transzkript, variáns
Próbaszekvenciák típusa	Oligonukleotid RNS vagy DNS	Oligonukleotid RNS vagy DNS	Oligonukleotid próbák	Taqman próba	Taqman próba
Próbaszekvenciák mérete	50-300mer	150-300mer	60mer	13-18mer	13-18mer
Kiindulási RNS mennyiség	10-30 µg	5-20 µg	1-10 µg/minta	>1 ng	akár 1 ng
Amplifikáció	In vitro transzkripció/ ninc	In vitro transzkripció/ ninc	T7 vagy PCR alapú amplifikáció	PCR alapú amplifikáció	PCR alapú amplifikáció
Jelölés/ Kimutatás	Radioaktív/ Biotin	Radioaktív/ Biotin	2 szín jelölés Cy3/Cy5	1 szín jelölés FAM-MGB	1 szín jelölés FAM-MGB
Speciális felszerelés	Hibridizációs kamra, mosó-jelölő automata, jeldetektálás	Hibridizációs kamra, mosó-jelölő automata, jeldetektálás	Hibridizációs kamra, mosó-jelölő automata, jeldetektálás	Q-PCR készülék, plétfuga	Q-PCR készülék, speciális centri fuga
Idő/futás	3-5 nap	3-5 nap	24 óra	3 óra	2 óra
Minta/futás	8-10 minta/1-2 gén	20-22 minta/10-12 gén	1 minta/teljes genom	1 minta 96 génre is, flexibilis elrendezés	1 minta 384 génre is, flexibilis elrendezés

12. táblázat: A génexpressziós vizsgálatokra alkalmazott módszereink előnyei és hátrányai

	Előnyök	Hátrányok
<i>Northern blotting</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Nincs speciális berendezésigény •Több minta egyszerre történő vizsgálata 	<ul style="list-style-type: none"> •Nagyobb kiindulási mintaigény •Hibridizációs technológia érzékenysége •Kontrollok bonyolultabb alkalmazhatósága •Hosszú munkafolyamat
<i>RPA</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Nincs speciális berendezésigény •Több minta egyszerre történő vizsgálata 	<ul style="list-style-type: none"> •Nagyobb kiindulási mintaigény •Hibridizációs technológia érzékenysége •Kontrollok bonyolultabb alkalmazhatósága •Hosszú munkafolyamat
<i>Microarray</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Teljes genom szintű vizsgálat •Több szintű kontroll •Kisebb mintaigény •Többféle analízis lehetősége •Fajlagosan kisebb reakcióköltség 	<ul style="list-style-type: none"> •Speciális berendezések igénye •Hibridizációs technológia érzékenysége •Cy3 és Cy5 nem egyforma kötődése
<i>Q-PCR</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Egy vagy néhány gén vizsgálata •Szabad kontrollválasztás •Kis mintaigény •Megbízható, elfogadott technológia •Gyors munkafolyamat •Kisebb reakcióköltség /génenként 	<ul style="list-style-type: none"> •Speciális berendezések igénye •Több pipettázási lépés-nagyobb hibázási lehetőség
<i>TLDA</i>	<ul style="list-style-type: none"> •Útvonalak, egyedi génszettek vizsgálata •Szabad kontroll választás •Megbízható, elfogadott technológia •Minimális mintaigény •Kis munkaigény •Sztenderd, gyors munkafolyamat •Kisebb reakcióköltség génenként 	<ul style="list-style-type: none"> •Speciális berendezések igénye •Zárt rendszer •Adatértékelés bonyolult

5.2.2 Az IP6 kezelés által kiváltott génexpressziós változások

Munkánk során először az IP6-tal kezelt K562 mintákban jelenlévő teljes genomi mRNS szintű változásokat vizsgáltuk annak érdekében, hogy a kezelés hatására megváltozott és a jelátviteli útvonalakon fontos gének expresszióját a későbbiekben egy időbeli kezeléssorozaton Q-PCR-rel is azonosítani tudjuk. Ennek segítségével igazoltuk, hogy 1818 humán transzkript mRNS szintje változott meg a 750 μ M koncentrációjú IP6 kezelést követő 1 órán belül, míg az 5 mM-os kezelés után 12 órával 1243 transzkript mutatott változást (Bozsik és mtsai, 2007).

A *microarray* adatok alapján a hiszton gének expressziójának csökkenése volt a legszembetűnőbb mindkét kezelés esetében. Mivel a *de novo* hisztonok megjelenése kulcsfontosságú a nukleoszómális komplex kialakulásában a DNS replikációja során, ezért a hiszton gének expressziójának csökkenése az IP6 sejtproliferációs gátló hatására utal (Polo és Almouzni, 2005). Ismert, hogy a telomeráz aktivitás fenntartása alapvető a legtöbb daganatsejt kontrollálatlan sejtproliferációs képességének fenntartásában. Mind a *microarray*, mind pedig a későbbi Q-PCR validálás a telomeráz komplex kulcsenzimének, a TERT génexpressziójának csökkenését jelezte IP6 kezelést követően, amely szintén a szer citotoxikus hatását alátámasztó eredmény (York és mtsai, 2004; Jagadeesh és Banerjee, 2006; Bozsik és mtsai, 2007).

Jelentősnek ítéljük, hogy az IP6 kezelés hatására a leukémiákban aktivált onkogének expressziójának csökkenését, míg a tumorsuppresszorok valamint néhány pro-apoptotikus gén mRNS szintjének emelkedését tapasztaltuk, amely összhangban van a mások által megfigyelt eredményekkel (Deliliers és mtsai, 2002). Vizsgálataink során a MYC, Ha-RAS, Ki-RAS mRNS szintjének csökkenését tudtuk kimutatni IP6 kezelést követően. Kísérleti eredményeinket az irodalmi adatokkal összevetve szembetűnik néhány érdekes hasonlóság abban a tekintetben, hogy PI3K/MAPK útvonalon szereplő gének csökkent expressziója mellett sem az *array*, sem a Q-PCR vizsgálatok nem bizonyították a PI3K, mint kulcsenzim expressziójának csökkenését (Huang és mtsai, 1997; Morceau és mtsai, 2000; Bozsik és mtsai, 2007).

A tumorok fejlődésének alapvető velejárója az új erek képződésre való képesség, ennek gátlásra vonatkozó génexpressziós jeleket főleg a nagyobb kezelési dózis alkalmazásával tapasztaltuk a *microarray* futások alapján, ezeket azonban Q-PCR-rel nem erősítettük meg. Az irodalomból vett példák alapján azonban már kimutatták korábban az IP6 angiogenezis elleni képességét, amely mélyrehatóbb kísérletek hiányában nem egyértelműen hozható összefüggésbe a K562 leukémia sejteken tapasztaltakkal (Steinman és mtsai, 1994, Vucenik és mtsai, 2004, Bozsik és mtsai, 2007).

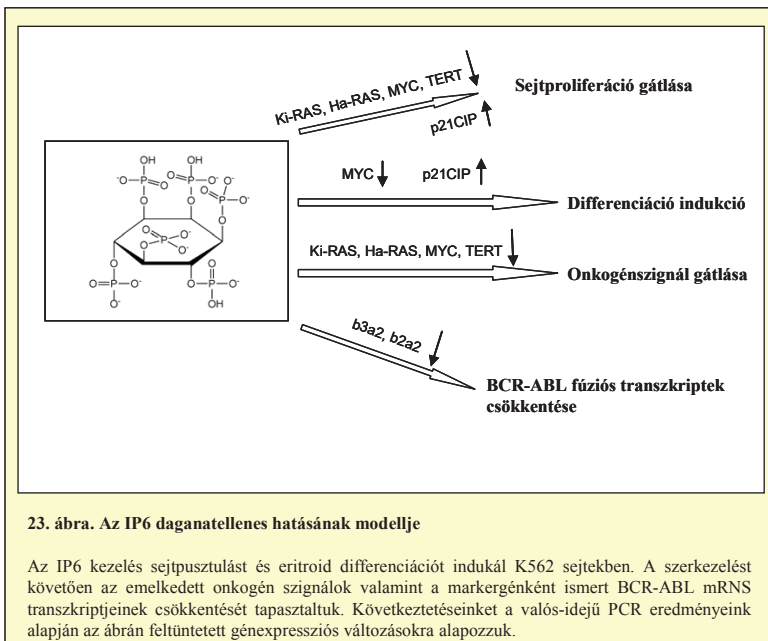
Az IP6 kezelés által érintett útvonalak esetében a kisebb dózissal kezelt K562 sejtekben a Wnt és az Insulin-IGF útvonal, a sejtosztódás gátlása és az onkogének expressziójának csökkenése volt a legszembetűnőbb. Az 5 mM IP6 alkalmazásával az általános immunológiai és gyulladásos folyamatok, valamint az EGF és FGF útvonal génjei mutattak a *microarray* adatok alapján génexpressziós változást. Ezen eredményeinket azonban nem erősítettük meg Q-PCR-rel, hanem az előre kiválasztott apoptotikus, differenciációs valamint leukémia markergének meghatározását tűztük ki célul, amellyel a sejttani szinten tapasztalt eredményeinket kívántuk támogatni. Ezzel összhangban – az eddig alkalmazott *microarray* vizsgálatokhoz képest – a teljes genomi *microarray* vizsgálatainkkal kiterjesztettük azt a korábbi kísérletsorozatot, amelyek az IP6 kezelést leukémia modellen végezték (Deliliers és mtsai, 2002; Bozsik és mtsai, 2007).

A génexpressziós BAX/BCL-2 arány meghatározása alkalmas marker az apoptotikus folyamatok érintettségének eldöntésére (Oltvai és mtsai, 1993). Előszűrő módszerünkkel erős idő- és dózisfüggő apoptotikus mintázatot azonosítottunk, amelyet a későbbi Q-PCR eredményeink nem igazoltak. Nagyobb dózissal egy gyorsan emelkedő, de tranziens jelleget tapasztaltunk, míg a kisebb koncentrációjú kezeléssel egy késleltetett hatás mellett nem karakterisztikus lefutású értékeket kaptunk a BAX/BCL-2 arányban. Összességében elmondható, hogy az IP6 kezelés esetében a sejttani eredményeinknek megfelelően nem tapasztalhatóak az apoptózis „molekuláris jelei”. Ezen eredmények ellentmondanak azonban a mások eredményeinek (Deliliers és mtsai, 2002; Singh és mtsai, 2003; Bozsik és mtsai, 2007).

Az eritroid differenciáció tekintetében *microarray* technológiával nem mutattak változást az érintett útvonalak vagy géncsoportok. Q-PCR-rel ennek ellentétes bizonyítékeként a WAF1/CIP1 gén mRNS szintjének jelentős emelkedését azonosítottuk, amely közismert differenciációs markerként szerepel az irodalomban (Steinman és mtsai, 1994; Bozsik és mtsai, 2007). Mások IP6 kezeléssel az intracelluláris Ca^{++} koncentráció megemelkedését tapasztalták, amely a leukémia sejtek dendritikus irányba történő differenciálódását is elősegítheti (Shamsuddin és mtsai, 1992; Engels és mtsai, 1999). Bonyolítja a képet a PKC gén aktiválódása, amelyet viszont a makrofág típus felé történő differenciálódási folyamatban azonosítottak (Nickel és Belury, 1999), tehát a leukémia sejtekben az IP6 kezelés differenciációt serkentő képességének pontosabb tisztázására mélyrehatóbb vizsgálatokra van szükség.

Legfontosabb eredményként első alkalommal bizonyítottuk, hogy a BCR-ABL fúziós markergén expressziója csökken 5 mM IP6 kezelést követően K562 sejtekben. Mindkét fő mRNS transzkript csökkenését tapasztaltuk, amely azonban csak a magasabb dózis mellett volt tapasztalható (Bozsik és mtsai, 2007). Bizonyított tény, hogy a BCR-ABL fúziós fehérje csökkenése miatt a leukémia sejtek szaporodása gátlódik, valamint ezen sejtekben az apoptózis és a differenciáció folyamatai aktiválódnak (Rangatia és Bonnet, 2006). Az IP6 kezelések által az érintett géneket és változásait összegzi a **23. ábra**.

Mindezeket a tényezőket figyelembe véve fontos hangsúlyozni, hogy ma még pontosan nem ismerjük az IP6 lehetséges szerepét a leukémiák elleni kemoterápiás alkalmazások tekintetében. Eredményeink mégis többnyire összhangban vannak a mások által leírt molekuláris és sejttani jelenségekkel és mindenképpen kiegészítik valamint kiszélesítik az IP6 daganatellenes hatására vonatkozó ismeretünket K562 leukémia modellen.



5.2.3 *A Ribavirin kezelés által kiváltott génexpressziós változások*

A daganatos sejtosztódás gátlásának egyik alkalmazott iránya, hogy a gyógyászatban már használatos szereket próbálnak ki egyedülként avagy kombinációs kezelésként. Ezen gyógyszerek hatásmechanizmusai többnyire ismertek, azonban például egy vírusellenes szintetikus szer alkalmazásának körülményei és hatékonysága kérdéses és megfejtendő a ráksejtek elleni harcban. Fontos tudni, hogy a malignus sejtek ellen használt szerek felhasználásának egyik irányzata, az egyes szignálutakon ható onkogének működésének gátlását célozza meg (Krengel és mtsai, 1990). Sejtenyészeteken végzett kísérletek tanúsítják, hogy a tumorsejtek szaporodásának gátlása és a tumoros transzformáció szuppressziója érhető el az onkogének kifejeződésének csökkentésével (Varmus, 1989). A géntermék szintjén történő beavatkozások széles tárházának célpontja a legtöbb esetben az onkogén mRNS terméke. A mitotikus szignálrendszer több támadáspontot is felkínál, és ezek vizsgálhatóak olyan hatóanyagokkal, amelyek a daganatsejtek indukált differenciációját képesek kiváltani az ott folyamatos aktivitásra kényszerült onkogén(ek) (például a MYC) működésének csökkentésével.

Vizsgálataink kezdeti fázisában krónikus mieloid leukémia sejtekben az IMPDH enzim gátlószerevel, a Ribavirinnel sikerült az amplifikált MYC onkogén fokozott kifejeződését csökkentenünk (Weber és mtsai, 2003; Olah és mtsai, 2006). A 10 μ M koncentrációjú Ribavirinnel kezelt K562 sejtenyészetből különböző időpontokban vett mintákban határoztuk meg Northern analízis és RPA technológia segítségével a MYC gén kifejeződését. A sejtekből származó teljes RNS mennyiségen végzett kísérletsorozat eredményeként a MYC onkogén mRNS szintjének karakterisztikus csökkenését tudtuk kimutatni, amely közvetlen kapcsolatban lehet a Ribavirinnel kezelt sejtek programozott sejthalálának és differenciációs programjának beindításában. A MYC központi szerepet tölt be a sejt életfolyamataihoz közvetlenül kapcsolódó különböző genetikai útvonalak (pl: RAS-MAPK, AKT-PI3K útvonalak) szabályozásában, ebben az értelemben a szaporodó sejtek fiziológiás körülményeinek megváltozásának jelző funkcióját is ellátja (Dang, 1999; Grandori és mtsai, 2000).

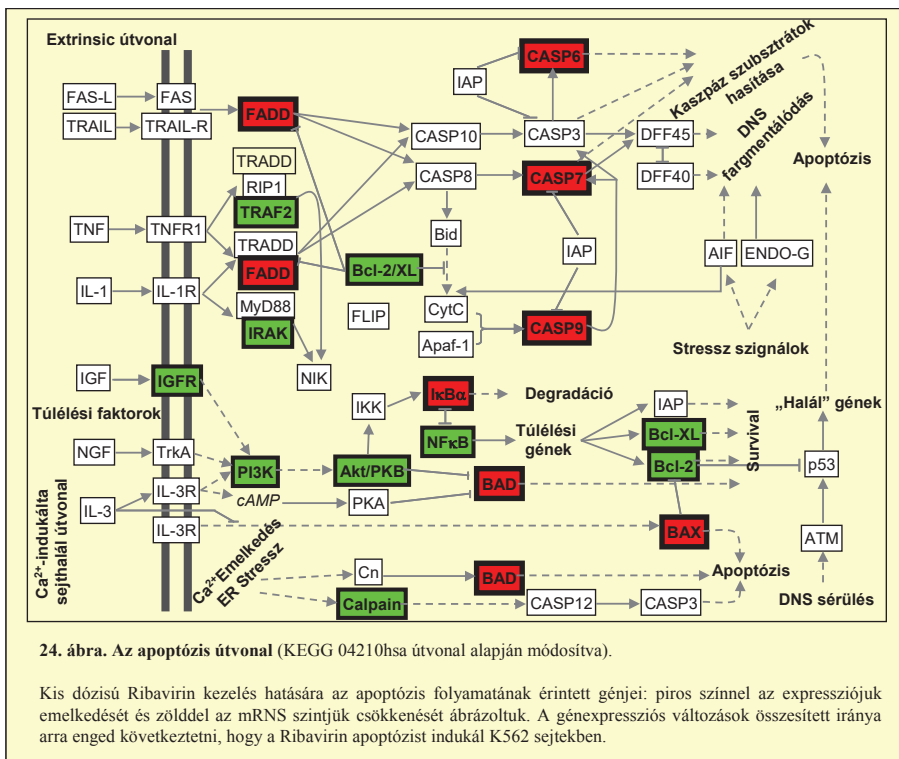
A kísérleteink eredményeképpen kapott csökkenő MYC expressziós profil két fázisból áll. A kezelést követő nagyon korai (30 perc) válasz valószínűleg közvetlen kapcsolatba hozható a MYC onkogén transzkripciójának gátlásával avagy az azt szabályozó különböző faktorokkal. A második fázis – amelyet 24 órával a kezelés után figyeltünk meg – valószínűleg nem közvetlenül az onkogénre ható tényezőknek köszönhető, hanem a drog alkalmazásának ún. másodlagos következménye lehet; például a protein szintézis nagyon erős gátlása, vagy éppen más gének kifejeződésének megváltoztatásával különböző jelátviteli utak aktiválódhatnak/gátlódhatnak, és következményképpen ezt a MYC expresszió megváltozásában tudtuk azonosítani. Összességében az onkogén kifejeződésének korai lépése látszik specifikusnak, a Ribavirin hatása nagyon erősen, karakterisztikusan megmutatkozik a MYC expressziójának megváltozásában, sőt az is valószínűsíthető, hogy az átíródott Myc fehérje mennyiségének csökkenésével magyarázhatóak a sejtszinten tapasztalható antiproliferatív jelek. Az általunk elért eredmények összhangban vannak a már korábban publikált adatokkal, amelyekben K562 sejtvonalon, más szerek alkalmazásával hasonló hatást tudtak kimutatni (Olah és mtsai, 1996; Csokay és mtsai, 1997; Weber és mtsai, 1999; Kókény és mtsai, 2009).

Kísérleteink második szakaszában ezen eredményeinkre tekintettel terjesztettük ki a vizsgált mRNS-ek számát a teljes transzkriptomra; alkalmaztuk a 15 μ M-os (IC_{50} ; 120 óra) és 50 μ M-os dózisokat, és megvizsgáltunk fontos útvonalak (apoptózis, differenciáció, transláció iniciáció gátlása, guanilát/purin anyagcsere, onkogenezis és a sejtszignalizáció) génjeinek kifejeződését is.

A 15 μ M Ribavirinnel végrehajtott kezelés hatására *microarray* módszerrel azonosítottuk, hogy 866 gén expressziós szintje emelkedett meg, míg 830 gén mRNS mennyisége csökkent K562 sejtekben.

Az apoptózis folyamatában szerepet játszó gének közül a BAD pro-apoptotikus gént inaktiváló PI3K vagy AKT/PKB *survival* gének expressziós csökkenést mutattak 15 μ M-os Ribavirin kezelést követően. Továbbá a Ca^{2+} -indukált sejthalál útvonalon található pro-apoptotikus BAX gén expressziója emelkedett meg a kezelés hatására, hasonlóan az ismert kaszpázok és társ molekuláinak mRNS szintjéhez (CASP6, CASP7, CASP9, FADD, IRAK). A

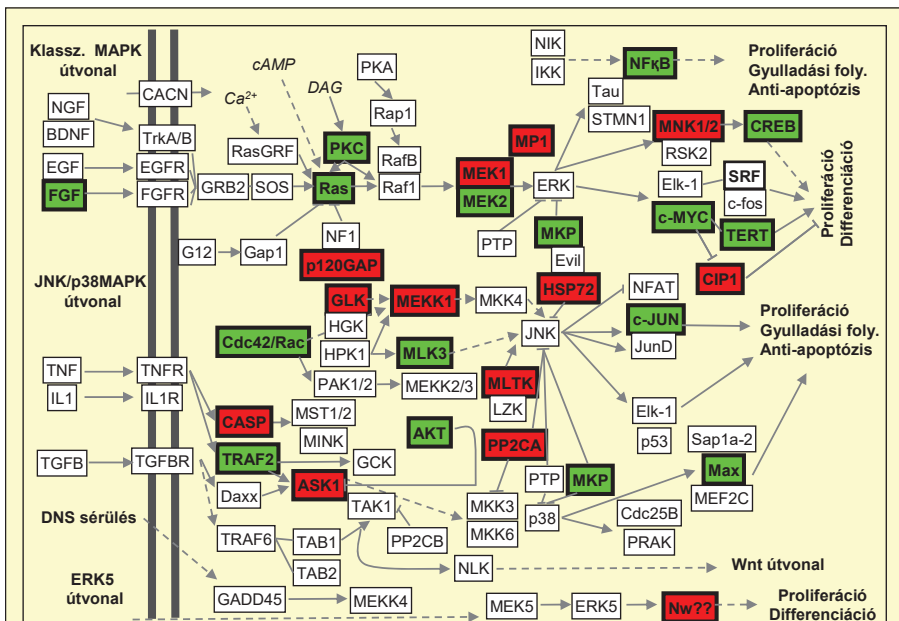
mitokondrium által közvetített apoptózis egyik kulcsgénje, az anti-apoptotikus aktivitású BCL2 szintjében csökkenést tapasztaltunk, összességében a pro- és antiapoptotikus gének expressziós szintjeinek összesített változásai is a Ribavirin kezelés apoptózist indukáló hatását támasztják alá (24. ábra).



24. ábra. Az apoptózis útvonala (KEGG 04210hsa útvonala alapján módosítva).

Kis dózisú Ribavirin kezelés hatására az apoptózis folyamatának érintett génei: piros színnel az expressziójuk emelkedését és zölddel az mRNA szintjük csökkenését ábrázoltuk. A génextpressziós változások összesített iránya arra enged következtetni, hogy a Ribavirin apoptózist indukál K562 sejtekben.

A mitogén-aktivált protein kináz (MAPK), mint a legismertebb jelátviteli út vonal változásait is vizsgáltuk. A klasszikus MAPK út vonal, azaz a RAS/RAF kaskád génei (RAS, RAF, MEK1, MEK2) mRNA szintjükben csökkenést mutattak, ezzel egyidejűleg a sejtszaporodás szabályozásában (CREB, JUN, MYC) szereplő kulcsgének expressziójában is ugyanilyen csökkenést tapasztaltunk. A 15 μ M-os Ribavirin kezelések által érintett MAPK út vonal gének változásait összegzi a 25. ábra.



25. ábra. A MAPK/ERK útvonal (KEGG 04010hsa útvonal alapján módosítva).

Kis dózisú Ribavirin kezelés hatására aktiválódott vagy csökkent expressziót mutató gének a MAPK/ERK útvonalban: piros színnel az expresszió emelkedését és zölddel az mRNA szint csökkenését ábrázoltuk. A génexpressziós változások összesített iránya arra enged következtetni, hogy a Ribavirin sejtpusztulást és az életben maradt sejtek differenciációját serkenti K562 sejtekben.

A Ribavirin az IMPDH enzim szintetikus inhibitora és ismert tény az is, hogy daganatsejtekben az IMPDH enzim megemelkedett aktivitása elsődlegesen az IMPDH II típusú izoformának köszönhető (Nagai és mtsai, 1991, 1992). Elsőként igazoltuk, hogy nagy dózisú (50 μ M) Ribavirin kezeléssel csökken az IMPDH II gén mRNA szintű expressziója K562 leukémia sejtekben. Eredményeink fontosságát alátámasztja az is, hogy Wright és munkatársai a Ribavirin társvegyületével – a szintén az IMPDH inhibitoraként ismert – Tiazofurinnal végzett kezelés eredményeként csökkent IMPDH aktivitást, de emelkedett mRNA szintet tapasztaltak (Wright és mtsai, 2004). Ezen ellentmondás feloldására adhat magyarázatot, hogy míg Wright és kollégái Northern analízis módszerével mérték az expressziós profilt valamint összemérték az IMPDH két izoformájának mRNA

változását, addig mi az érzékenyebb és pontosabb, polimerizáció alapú Q-PCR-rel valamint a rákban domináns II-típusú izoformára specifikus Taqman próbával dolgoztunk. Korai expressziós csökkenést tapasztaltunk a PARP gén esetében is, ami összhangban van az IMPDH gátlással és a purin anyagcserefolyamatok gátlásával is. A GMPS génextpressziós emelkedése kompenzációs mechanizmusként jelenhet meg a sejtekben a csökkent GTP szint következményeként (Virág és Szabó, 2002; Galmarini és mtsai, 2008).

Az apoptotikus folyamatok szabályozásának elvesztése jellemző a ráksejtekre, így a leukémia sejtekre is, és közismert tény, hogy a kemoterápiában alkalmazott szerekkel apoptózis indukálható (Del Principe és mtsai, 2005; Fesik és mtsai, 2005). Vizsgálataink során K562 sejtekben 15 és 50 μ M Ribavirin kezeléssel apoptózist indukáltunk, amely összhangban van Schlosser kutatócsoportjának eredményeivel, akik HepG2 sejteken Ribavirinnel apoptózist tudtak kimutatni a kaszpáz-3 markergén valamint a halálreceptorként ismert CD95 egyidejű aktiválódásával (Schlosser és mtsai, 2003). Elsőként bizonyítottuk, hogy Ribavirin kezelést (50 μ M) követően K562 sejtekben csökkent a CD95/FAS útvonala (FAS, FADD) génjeinek mRNS szintje, ezzel egyidejűleg emelkedett az expressziós szintje a TNFR szupercsalád tagjainak (TNFSR1A, TRADD, RIP), és pro-apoptotikus géneknek is, többek között a PUMA, NOXA, kaszpáz-2, -3, -6, -7, -9 és 10 géneknek (Kökény és mtsai, 2009). Az NF κ B transzkripciós faktor a gyulladás és immunfolyamatok ismert tagja, szerepét azonosították az apoptózis, a sejtproliferáció és migráció folyamataiban, valamint a tumorfejlődésben is (Karin és mtsai, 2002). Ribavirin kezelés hatására K562 sejtvonalban csökkent az NF κ B gén expressziója, amely kapcsolatba hozható az apoptózis serkentésével (Wang és mtsai, 1996). Érdekes tény, hogy az AKT/NF κ B útvonala gátlásával párhuzamosan a Ribavirin serkenti a citokróm-c felszabadulását a mitokondriumból, ezáltal a mitokondriális permeabilitást fokozza, amely alapja a mitokondrium által közvetített apoptotikus folyamatok beindításának. Ebben a folyamatban – az általunk is azonosított – kaszpáz 6 és 9 emelkedés is jelen van, és ezek az eredmények összhangban vannak egy, a gyulladás ellen alkalmazott szer, a Celecoxib hatásával, amely szintén gátolja az NF κ B gént és serkenti az apoptózist daganatsejtekben (Subhashini és mtsai, 2005). Eredményeink alapján megerősítést nyert, hogy a

Ribavirin kezelést követően aktiválódnak az apoptotikus útvonalak tagjai, és a programozott sejthalál beindításának tényét alátámasztják a kis dózisú kezelést követő 3. órában azonosított emelkedett BAX/BCL-2 arány, valamint a sejttani szinten tapasztalt jelenségek is. Összességében, a Ribavirinnel kezelt K562 sejteken azonosítható citotoxikus hatás hátterében a programozott sejthalál morfológiai és molekuláris jeleit határoztuk meg (Kökény és mtsai, 2009).

Munkacsoportunk első közleményei között publikálta az IMPDH inhibitorok eritroid differenciációt serkentő képességét, azonban a Ribavirin egyedüli alkalmazásának ezen aspektusát most írtuk le első alkalommal K562 sejteken (Olah és mtsai, 1988, 1990, 2006; Kökény és mtsai, 2009). A sejttani eredményeinknek, valamint az előzetes vizsgálatoknak megfelelően, 50 μ M Ribavirinnel a differenciáció serkentéséhez kapcsolható gének – mint a HBB, CD79A és az MPO – aktiválódását tapasztaltuk, míg az AKT1 és a MYC gének mRNS szintjének csökkenését mutattuk ki. Ezen korai génexpressziós változások egyértelműen a későbbi, látható citológiai jelekkel hozhatók kapcsolatba és molekuláris megfigyeléseinket összhangba hozzák a mások által leírtakkal is (Olah és mtsai, 1988, 1989; Pelengaris és Kahn, 2003; Saussoy és mtsai, 2004; Ausserlechner és mtsai, 2005). A Tiazofurinnal végzett kutatásokból is bizonyítást nyert, hogy a MYC kifejeződésének csökkenése segít a differenciációs program beindításában, valamint az apoptotikus folyamatok serkentésében (Olah és mtsai, 1996; Cocco és mtsai, 1996; Carnero és Beach, 2004).

Q-PCR eredményeink bizonyítják, hogy K562 sejtekben a Ribavirin daganatellenes hatásának hátterében álló intracelluláris útvonalak közül érintettek többek között a MAPK/ERK és a PI3K/AKT szignalizációs útvonalak is. A kezelést követően csökkent a sejtekben az IP3 koncentráció valamint a sejtproliferációt serkentő gének expressziója is (Weber és mtsai, 2003). A leukémia sejtekben aktiválódott gének közül nagy dózisú (50 μ M) Ribavirinnel a MAPK/ERK szignalizáció érintett génjei, azaz az ABL1, MYC, Ha-RAS, TERT, CCND1, CCNE1, CHEK1, PAK1 és MDM2 gének expressziójának gátlását tapasztaltuk a kezelést követő 48 óráig minden vizsgált időpontban. Ezek közül például a MYC, RAS, TERT és ABL1 gének mRNS szintjének csökkenését bizonyítottuk 15 μ M Ribavirinnel is (Olah és mtsai, 2006). A klasszikus tumorszuppresszorok, úgymint a

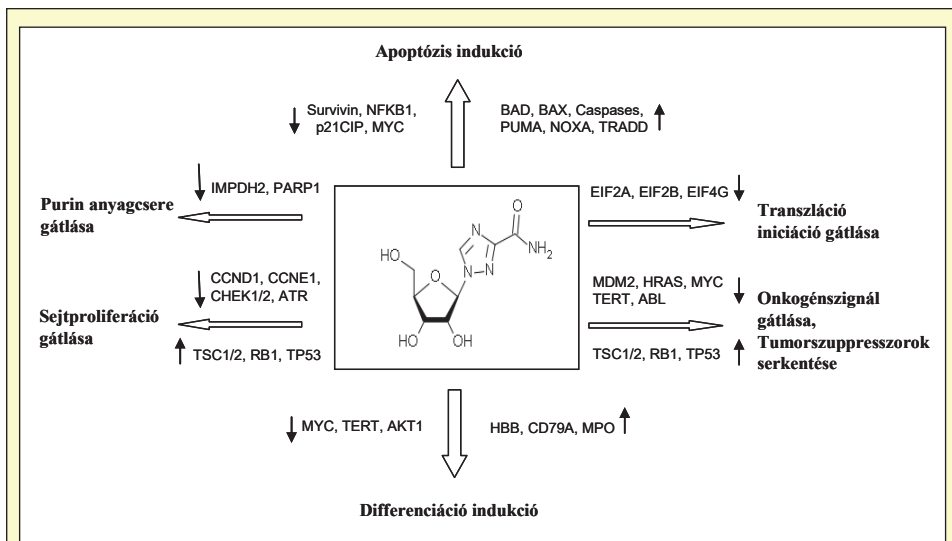
TP53, RB1 és a TSC aktiválódása mellett a CTNNB1, IFNAR-ok, PI3K, PKA, PKC, és SOS gének inaktiválását tapasztaltuk az 50 μ M Ribavirin kezelést követően (Kökény és mtsai, 2009). Vaque és munkatársai közölték, hogy a MYC onkogén gátolja a RAS gén hatását, és ezzel képes a daganatképződést elősegíteni leukémiákban (Vaque és mtsai, 2005). Ismert, hogy a legtöbb normál-tumor átalakulásban aktív szerepet játszik a MYC és a RAS (Maru, 2001; Bachireddy és mtsai, 2005). Alaphipotézisünk megerősítésében fontos szerepet játszottak azok a közlemények, amelyek szerint a Ribavirin az IMPDH gátlásán keresztül csökkenti a GTP szintet és így a Ras-GTP szintet is (Yamada és mtsai, 1990, Vallee és mtsai, 2000, Weber és mtsai, 2003). Munkacsoportunk a Tiazofurinnal történt kezeléssel már sikeresen bizonyította a RAS és MYC onkogének mRNS szintjének csökkenését K562 leukémia sejtekben (Olah és mtsai, 1988, 1989, 1990).

Nagy dózisú (50 μ M) valamint kis dózisú (15 μ M) Ribavirinnel szignifikáns génexpressziós csökkenést tudunk kiváltani az aktiválódott ABL onkogén esetén, és 15 μ M-os kezeléssel a b3a2 fő transzkriptvariáns gátlását is bizonyítottuk K562 sejtekben (Kökény és mtsai, 2009). Ezen eredményeink fontossága még jobban előtérbe kerülhet, amennyiben Felsher és munkacsoportja által elképzelt koncepció (*rehabilitation of cancer*) alapján a daganatos folyamatok visszafordíthatóak és a daganatok kezelhetőek, amennyiben célzottan egyes központi géneket – mint például az aktiválódott MYC – inaktiválunk (Felsher és Brandon, 2003; Shachaf és Felsher, 2005).

Kentsis és munkatársai bebizonyították, hogy a Ribavirin egér daganatsejtenyészetekben és *in vivo* is gátolja a transzláció iniciáció mechanizmusát oly módon, hogy képes bekötni az eIF4E transzlációs iniciációs faktor kötőhelyére a GTP helyére. Ezzel a mechanizmussal képes csökkenteni számos onkoprotein – mint például a cyclin D1 – szintjét, azonban nincs hatással az mRNS szintjükre (Kentsis és mtsai, 2004, 2005). Bizonyítottuk, hogy nagy dózisú Ribavirin kezeléssel K562 sejtkben az eIF4G, eIF2A és eIF2B iniciációs faktorok mRNS szintje csökken, ami összhangban van más laboratóriumokban tapasztaltakkal. Akut stádiumban levő mieloid leukémiás betegekből származó tumorsejteken a Ribavirin képes csökkenteni az eIF4E-mediált daganatnövekedést, és ez a tény is szerepet játszhat

abban, hogy a Ribavirin a daganatterápiában alkalmazva hatással van mint „RNS-regulon” (Topisirovic és mtsai, 2003; Culjkovic és mtsai, 2007).

Munkánk eredményeként bizonyítást nyert, hogy a Ribavirin – jól ismert vírusellenes hatása mellett – egyedüli szerként alkalmazva is alapvetően befolyásolja a K562 leukémia sejtek génexpressziós profilját. IMPDH inhibítorként csökkenti a purin anyagcserét, gátolja a fehérjeképződést a transzláció kezdeti lépéseinek megakadályozásával, valamint a leukémia sejteket a programozott sejthalál és az eritroid differenciáció irányába kényszeríti. A Taylor csoportja által közölt *microarray* eredmények alapján azonban kiderült, hogy a normál vörsejtekre és azok transzkripciós szintjére nincs gátló hatással a Ribavirin (Taylor és mtsai, 2004). Ezek alapján nyerhetett értelmet egy olyan kezdeményezés, amely a Ribavirin kezelés megkezdését célozta meg akut stádiumban szenvedő leukémiás pácienseken (www.ribatrial.com). A Ribavirin kezelések által leukémia sejtekben kiváltott hatásokat szemlélteti a **26. ábra**.



26. ábra. A Ribavirin daganatellenes hatásának modellje

A Ribavirin kezelés apoptózist és eritroid differenciációt indukál K562 sejtekben. A sejtproliferáció gátlása mellett kiváltja az emelkedett onkogén szignálok csökkentését valamint a purin anyagcsere, a transzláció inicializáció géneinek mRNS szintű gátlását és tumorsuppresszorok aktiválását is. Következtetéseinket a valós-idejű PCR eredményeink alapján az ábrán feltüntetett génexpressziós változásokra alapozzuk.

Az alkalmazott vizsgálati megközelítések nyilvánvaló gyengéje avagy lehetséges kiindulópontja lehet a további kutatásokhoz, hogy a daganatok kialakításáért felelős összes gén funkciójának még részletesebb megértéséhez vizsgálatainkat a szabályozás minden szintjére ki kell terjeszteni. Eredményeink, és az ismert szakirodalmi adatok alapján feltételezhetjük, hogy a későbbiekben a Ribavirint is – jól ismert vírusellenes alkalmazási területe mellett – a daganatkutatás és a daganatterápia hatásos rákellenes szereként fogják alkalmazni.

ÖSSZEFOGLALÁS

A célkitűzésekben megfogalmazott kutatási program során nyert eredményeink a következőkben foglalhatók össze:

- 1 Optimalizáltuk a Northern hibridizáció és az RPA technológia körülményeit, majd ezekkel a módszerekkel meghatároztuk a MYC onkogén kifejeződését kis dózisú Ribavirin kezelést hatására. A későbbi IP6 és a Ribavirin kezelések lehetséges transzkriptomikai válaszának előszűrése *microarray* technológiával történt, majd az előre szelektált gének expressziós profilját Q-PCR-rel erősítettük meg.

A TLDA (Taqman alapú kis denzitású génexpressziós *array*) módszer tűnt a legalkalmasabbnak arra, hogy a kiválasztott és a daganatgenetikai szempontból érdekesnek tűnő gének kifejeződését egyszerre detektálhassunk valós-idejű kvantitatív PCR módszerrel. Ez a technika különösen hatékony az *array*-eken mért génexpressziós változások nagy teljesítményű, gyors és költséghatékony megerősítésére, mindazonáltal teljesen flexibilisen vagy előre összeállított géncsoport-panelek célzott expressziós vizsgálatára is. Megítélésünk szerint ez a sztenderd metodika a legmegfelelőbb az mRNS szintű molekuláris mintázatok feltérképezésére.

- 2 Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy az IP6 képes a K562 leukémia sejtek szaporodását gátolni és ezen citotoxikus hatás a szer alkalmazási idejének és koncentrációjának növelésével erősödik. Bizonyítottuk, hogy az IP6 nem indukál apoptózist K562 sejtekben, azonban a kezelés (5 mM) 120. órájában az eritroid differenciációt mutató benzidin pozitív sejtek száma a kontroll mintákhoz képest hatszoros emelkedést mutatott.

Microarray kísérleteink során – mindkét alkalmazott szerkoncentráció (750 μ M és 5 mM) tekintetében – a génexpresszió csökkenését azonosítottuk a hiszton gének és a DNS replikáció gének körében úgymint az ismert onkogének, a WNT szignálút vonal és a sejtprolifерációt szabályozó útvonalak (inzulin-IGF, PI3K) génjei között. Jelentős mRNS szintű expressziós emelkedést tudtunk kimutatni a T és B

sejtes immunválasz kialakításáért felelős gének, kemokinek és citokinek esetében. Az 5 mM-os kezeléssel az angiogenezisben ismert gének expressziójának csökkenését azonosítottuk, azonban egyik koncentráció alkalmazásával sem tapasztaltunk az eritroid irányú differenciáció felé mutató expressziós változásokat.

Q-PCR módszerrel sikerült megerősítenünk a MYC, TERT, Ha-RAS és a Ki-RAS gének expressziós csökkenése mellett a CIP1/WAF1 transzkripciójának emelkedését, azonban nem tapasztaltunk emelkedést az apoptózisra jellemző BAX/BCL-2 mRNS szint arányában. Elsőként bizonyítottuk továbbá, hogy a BCR-ABL fúziós markergén expressziója csökken 5 mM IP6 kezelést követően K562 sejtekben.

- ❸ Kimutattuk, hogy Ribavirin kezelés hatására leukémia sejtek (K562), petefészek karcinóma sejtek (OVCAR-5), emlőtumor sejtek (MCF-7) valamint hepatocelluláris karcinóma sejtek (HepG2) szaporodása lecsökken. A Ribavirin sejtproliferációt gátló aktivitása jelentősen megemelkedett a kezelési idő és az alkalmazott szerkoncentráció növelésével. Kísérleteink eredményeként sikerült azonosítanunk a Ribavirinnel kezelt K562 sejtenyészetben az apoptotikus és eritroid differenciációs jeleket mutató sejtek számának jelentős emelkedését, és ezen sejtek mennyisége az alkalmazott szer koncentrációjának növelésével jelentősen emelkedik.

Optimalizált Northern analízissel és RPA módszerrel azonosítottuk a MYC onkogén mRNS szintjének jelentős csökkenését K562 sejtekben Ribavirin kezelés (10 μ M) hatására.

A 15 μ M Ribavirin alkalmazásával K562 sejteken *microarray* módszerrel 866 gén expressziós szintjének emelkedését és 830 gén mRNS mennyiségének csökkenését tapasztaltuk, ezek a sejtciklus szabályozásában, az apoptózisban, a nukleinsav anyagcsere folyamataiban, a transzkripció szabályozásában, a WNT útvonalon, a PI3K szignálútvonalon, a MAPK és IKBkináz/NF κ B túlélési kaskádban, az elektron transzport folyamataiban, az oxidatív foszforiláció, a riboszómák felépítésének, a fehérjék és az aminosavak anyagcseréjének génjei között szerepelnek.

Q-PCR technikával azonosítottuk a MYC onkogén, a TERT, a Ki-RAS, az IMPDH I és az IMPDH II expressziójának csökkenését, a CIP1/WAF1 gén és a

differenciációs markerként ismert globin-A mRNS szintjének emelkedést. A Ribavirin apoptózist-indukáló képességének validálása során a BAX/BCL-2 gén mRNS arányában 2,5-szeres emelkedést tapasztaltunk. Továbbá sikerült a b3a2 transzkript – a BCR/ABL fúziós gén legfontosabb mRNS variánsa – és az ABL onkogén mRNS expresszióját 65%-ra csökkenteni 12 órás Ribavirin kezelést követően.

TLDA módszerrel bizonyítást nyert, hogy a nagy dózisu (50 μ M) Ribavirin kezelés a kaszpázok aktivációján keresztül és a mitokondriális cytochrome-c felszabadulás útján serkenti az apoptotikus folyamatokat leukémia sejtekben. Bizonyítottuk, hogy a Ribavirin eritroid differenciációt indukáló képessége mögött a β -globin (HBB) gén expressziójának emelkedése áll. Első alkalommal sikerült azonosítanunk, hogy a K562 leukémia sejtekben elsődlegesen aktív IMPDH II mRNS szintje szignifikánsan csökkent az 50 μ M-os kezelést követően. A Ribavirin által kiváltott translációs gátlás vizsgálata során sikerült azonosítanunk, hogy az EIF2A és EIF2B génexpressziós csökkenése mellett az EIF4G1 gén mRNS szintje is a felére csökkent. Az onkogenezis és a sejtciklus szabályozás csoportjába tartozó gének (ABL1, CCND1, CCNE1, CDKN1B, HRAS, MDM2, MYC, PAK1, TERT) expressziója minimum a felére csökkent, míg a klasszikus tumorszuppresszorok (TP53, RB1 és a TSC2) mRNS szintje emelkedett, alátámasztva ezzel a Ribavirin daganatgátló hatását.

- 4 A két szerhatás tekintetében bizonyítottuk, hogy képesek K562 leukémia sejtek szaporodásának gátlására, illetve sejtteni szinten azonosítható a differenciációt indukáló képességük is. A Ribavirin kezeléseket követően azonosítottuk a programozott sejthalál serkentését, amelyet azonban nem tapasztaltunk az IP6 esetében. A sejtteni jelek hátterében azonosítható molekuláris biomarkerek és útvonalak vizsgálata során mind a Ribavirin, mind pedig az IP6 kezelések esetében jellegzetes génexpressziós-modul változásokat tapasztaltunk a sejtproliferáció és az onkogén szignálok gátlásában valamint a differenciáció indukcióban szereplő gének esetében. Első ízben azonosítottuk Ribavirin kezelést követően a purin anyagcsere központi enzimének, az IMPDH-nak az mRNS szintű gátlását is. A legújabb eredményekkel összhangban a Ribavirin transláció iniciáció gátlásában betöltött

szerepének tisztázása során elsőként azonosítottuk eukarióta iniciációs faktorok mRNS szintű expressziós csökkenését. Munkánk egyik legfontosabb hozadéaként első ízben bizonyítottuk, hogy mind az IP6, mind pedig a Ribavirin kezelés képes a krónikus mieloid leukémiák markergénjének, a BCR-ABL fúziós gén mRNS szintjének csökkentésére. Kutatási eredményeink támogatják azon elképzelésünket, miszerint ezen szerek a daganatterápia területén is alkalmazást nyerhetnek akár egyedüli, akár kombinációs kezelésben.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, *Prof. Dr. Oláh Edit* akadémikusnak. Ő tette lehetővé számomra, hogy diákkörös, szaklaboros majd doktorandusz hallgató koromban is érdekes, korszerű témákat modern módszerekkel kutathassak. Professzorasszony az Országos Onkológiai Intézet Molekuláris Genetikai Osztályán nemzetközi színvonalú kutatóműhelyet alakított ki, minden időben támogatott és minden feltételt megteremtett kutatómunkámhoz, amelynek segítségével betekintést nyerhettem a molekuláris genetika széleskörű ismereteinek tárházába, valamint a daganatkutatás nehéz, de szép világába. Ezúton szeretnék köszönetet mondani Neki mindenért, amit értem tett.

Külön köszönöm *Dr. Papp Jánosnak* a mérhetetlenül sok segítséget, a bizalmát, az értékes tanácsokat és a barátságát. Hálás vagyok az osztály többi munkatársának is, *Vaszkó Tibornak és Kovács Mariettának*, akikkel az inspiráló tudományos légkörben élvezet volt dolgozni. Köszönöm mindannyiuknak a szakmai beszélgetések és viták során elhangzott, megszámlálhatatlanul sok tanácsot és ötletet, amelyek nélkül kutatási eredményeim jó része nem születhetett volna meg.

Varga Tamásnének és Frankó Lajosnének külön köszönettel tartozom – a sokszor a hétvégéket is magába foglaló – sejtenyésztségi és kezelési eljárásokért. Köszönettel tartozom *Dr. Bozsik Anikónak* az IP6-tal végzett kísérletekben való aktív részvételéért, *Baloghné Kovács Máriának, Pongó Gabriellának* a munkában való együttműködésért, kedvességükért és a jó hangulatért.

Végezetül ez a munka soha nem jöhetett volna létre, ha Édesanyám és egész családom nem áll mögöttem szeretetteljes támogatással és biztatással. Feleségem *Zsuzsa*, valamint gyermekeim, *Eszter és Botond* létezése jelentette számomra a legnagyobb hajtóerőt és támaszt; köszönök Nekik minden együtt töltött pillanatot.

A DOKTORI ÉRTEKEZÉS RÖVID ÖSSZEFOGLALÁSA

A megfelelő daganatterápiás célpontoknak érzékenyeknek kell lenniük a gátlásukra kiválasztott gyógyszermolekulákkal szemben oly módon, hogy azok szelektíven pusztítsák a ráksejteket és ezzel egyidejűleg megkímélik a normál sejteket. A génexpressziós mintázat megváltozása jellemezheti a daganatok gyógyszeres kezelésének hatékonyságát. Jelen munkánk célja annak feltérképezése, vajon a két ismert biokémiai hatású tesztvegyület, a Ribavirin illetve az IP6 alkalmas-e a ráksejtek szaporodásának gátlására, célul tűztük ki a daganatellenes hatás molekuláris hatásainak feltárását.

Tanulmányunk első részében a bizonyítottan antivirális hatású, és az inozitol-5'-foszfát (IMPDH) enzim inhibitoraként ismert Ribavirin daganatgátló hatását vizsgáltuk. Daganat-sejttenyészeteken bizonyítottuk, hogy a Ribavirin rendelkezik antiproliferatív potenciállal valamint apoptózt és eritroid differenciációt indukál leukémia sejtekben. Alacsony dózisu (10 és 15 μM) Ribavirinnel kezelt K562 leukémia sejtekben az amplifikált MYC onkogén mRNS szintu szignifikáns expressziós csökkenését tapasztaltunk Northern-*blotting*, RPA, *microarray* és Q-PCR módszerekkel. Nagy dózisu (50 μM) Ribavirin kezelést követően Taqman Array technológiával bizonyítottuk 85 előre kiválasztott gén expressziós szintjének megváltozását, amelyek a daganatfejlődés szempontjából kulcsfontosságú sejtproliferációs folyamatokban, purin bioszintézisben, transzláció iniciációban, az onkogénikus jelátvitelben valamint a ráksejtek túlélésében szenvednek zavart.

Szakirodalomból ismert, hogy a természetben is előforduló polifoszforilált szénhidrát IP6 (inozitol-hexakiszfzfát) molekulának antiproliferatív és daganatellenes hatása van. K562 leukémia sejteken azonban ezideáig nem vizsgálták az IP6 molekuláris hatását. K562 sejtekben 750 μM és 5 mM IP6 is jelentős daganatsejtpusztulást eredményezett és a sejtekben beindította az eritroid differenciációs programot. Munkánk kiterjesztéseként *microarray* és Q-PCR módszerekkel igazoltuk, hogy az IP6 leukémiák elleni hatásmechanizmusa mögött számos olyan gén mRNS szintu megváltozása áll, amelyek daganatgenetikai szempontból fontos szabályozó hálózatokban találhatóak, többek között például a Wnt és IGF útvonalakban valamint a PI3-kináz kaszkádban.

Kutatásainkkal új irányból nyerhetük bepillantást a daganatsejtek gátlásának és a differenciáció iniciációjának megértésébe valamint a leukémia sejtekben

lejárászódo sejtsgnalizáció és génexpresszió folyamatok működésébe. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy az IP6 és a Ribavirin potenciális terápiás szerként is kipróbálhatók lennének a krónikus myeloid leukémiák kezelésében.

SUMMARY

Good therapeutic targets must be susceptible to specific inhibition by small-molecule drugs, and cancer cells should be more dependent on the activity of the target than normal cells. In tumors, however, the alterations of gene expression pattern play a central role in the effectiveness of drug treatment. In our present investigation, we tested whether application of Ribavirin or Inositol hexaphosphate (IP6), two test compounds with known biochemical effects, was effective against cancer cells, and aimed to elucidate the molecular mechanism of the anticancer effects.

In the first part of our study, we elucidated the anticancer activity of Ribavirin, an antiviral drug which is a known inhibitor of inositol-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH). Using human cancer cell lines we presented the potential of the drug to inhibit growth and induce the apoptotic and differentiation programs in leukemia cells. The effects of Ribavirin at low doses were studied in K562 cells by Northern analysis, RPA, microarray and Q-PCR. We detected that 10 and 15 μM of Ribavirin can significantly decrease the gene expression of the MYC oncogene. Using Taqman array technology we demonstrated that treatment with 50 μM of Ribavirin also modulated the expression of the majority of 85 pre-selected genes having roles in cell proliferation, purine biosynthesis, translation initiation, oncogenic signalling, and cell survival.

The anti-proliferative and anti-cancer activity of IP6, a naturally occurring polyphosphorylated carbohydrate, has also been reported. However, the mechanism of action of IP6 has not been fully elucidated in K562 human leukemia cells. A single treatment of K562 cells with IP6 (0.75 and 5 mM) resulted in a significant growth inhibition and the activation of the erythroid differentiation program. Through microarray and Q-PCR analysis we found that the anticancer effect of IP6 was also associated with the modulation of multiple genes involved in several regulatory networks, such as Wnt and IGF pathways and PI3 kinase signaling.

Our results provide new insights into the signaling events and the gene expression changes associated with growth inhibition and differentiation in leukemia cells and support a role for IP6 or Ribavirin as potential therapeutic agents in the treatment of chronic myeloid leukemia.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11:36-42.
2. Adjei AA. 2001. Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl. Cancer Inst.* 93:1062-1074.
3. Almog N, Rotter V. 1997. Involvement of p53 in cell differentiation and development. *Biochim. Biophys. Acta.* 1333:F1-F27.
4. Ausserlechner MJ, Obexer P, Geley S, Kofler R. 2005. G1 arrest by p16INK4A uncouples growth from cell cycle progression in leukemia cells with deregulated cyclin E and MYC expression. *Leukemia.* 19:1051-1057.
5. Bachireddy P, Bendapudi PK, Felsher DW. 2005. Getting at MYC through RAS. *Clin. Cancer Res.* 11:4278-4281.
6. Balmain A. 2001. Cancer Genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. *Nat. Rev. Cancer.* 1:77-86.
7. Baten A, Ullah A, Tomazic VJ, Shamsuddin AM. 1989. Inositol-phosphate-induced enhancement of natural killer cell activity correlates with tumor suppression. *Carcinogenesis.* 10:1595-1598.
8. Bertram JS. The molecular biology of cancer. 2000. *Mol. Aspects Med.* 21:167-223.
9. Black DM. 1997. Tumour suppressor genes and inheritance of cancer. In Peters, G. és Vousden, K. H. (szerk.). *Oncogenes and Tumor Suppressors*, Front. in Mol. Biology. 19:293-313.
10. Bos JL. 1997. Ras-like GTPases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1333:M19-M31.
11. Boveri T. 1914. Zur Frage der Entstehung Malignen Tumoren, Gustav Fisher, Jena. 1-64.
12. Bozsik A, Kökény Sz, Weber G, Olah E. 2007. Molecular mechanisms for the antitumor activity of inositol hexakisphosphate (IP6). *Cancer Genomics and Proteomics.* 4:43-51.

13. Bronchud J. 2000. Principles of molecular oncology. Humana Press.
14. Bullinger L, Valk PJ. 2005. Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 23:6296-6305.
15. Cameron CE, Castro C. 2001. The mechanism of action of ribavirin: lethal mutagenesis of RNA virus genomes mediated by the viral RNA-dependent RNA polymerase. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 14:757-764.
16. Carlo-Stella C, Regazzi E, Garau D, Mangoni L, Rizzo MT, Bonati A, Dotti G, Almici C, Rizzoli V. 1996. Effect of the protein tyrosine kinase inhibitor genistein on normal and leukemic haemopoietic progenitor cells. *Br. J. Haematol.* 93:551-557.
17. Carnero A, Beach DH. 2004. Absence of p21WAF1 cooperates with MYC in bypassing Ras-induced senescence and enhances oncogenic cooperation. *Oncogene.* 23:6006-6011.
18. Capanni M, Lorefice E, Benini MC, Biagini MR, Tozzi A, Salvadori E, Colagrande S, Surrenti C, Milani S. 2008. Occurrence of diffuse, poorly differentiated hepatocellular carcinoma during pegylated interferon plus ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C. *J. Chemother.* 20:380-384.
19. Ceballos E, Delgado MD, Gutierrez P, Richard C, Muller D, Eilers M, Ehinger M, Gullberg U, Leon J. 2000. c-Myc antagonizes the effect of p53 on apoptosis and p21WAF1 transactivation in K562 leukemia cells. *Oncogene.* 19:2194-2204.
20. Cocco L, Capitani S, Maraldi NM, Mazzotti G, Barnabei O, Gilmour RS. 1996. Inositol lipid cycle and autonomous nuclear signalling. *Adv. Enz. Regul.* 36:101-114.
21. Cotonat T, Quiroga JA, Lopez-Alcorocho JM, Clouet R, Pardo M, Manzarbeitia F, Carreno V. 2000. Pilot study of combination therapy with ribavirin and interferon alfa for the retreatment of chronic hepatitis B antibody-positive patients. *Hepatology.* 31:502-506.
22. Cropley JE, Martin DI, Suter CM. 2008. Germline epimutation in humans. *Pharmacogenomics.* 9:1861-1868.

23. Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JYN, Hong Z, Andino R, Cameron CE. 2000. The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nat. Med.* 6:1375-1379.
24. Culjkovic B, Topisirovic I, Borden KL. 2007. Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Cell Cycle.* 6:65-69.
25. Culjkovic B, Tan K, orolicki S, Amri A, Meloche S, Borden KL. 2008. The eIF4E RNA regulon promotes the Akt signaling pathway. *JCB.* 181:51-63.
26. Csokay B, Prajda N, Weber G, Olah E. 1997. Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sci.* 60:2157-2163.
27. Dang CV. 1999. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 19:1-11.
28. De Camilli P, Emr SD, McPherson PS, Novick P. 1996. Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science.* 271:1533-1539.
29. Deliliers LG, Servida G, Fracchiolla NS, Ricci C, Borsotti C, Colombo G, Soligo D. 2002. Effects of inositol hexaphosphate (IP₆) on human normal and leukaemic hematopoietic cells. *Br. J. Haematology.* 117: 577-587.
30. Del Principe MI, Del Poeta G, Venditti A, Buccisano F, Maurillo L, Mazzone C, Bruno A, Neri B, Irno Consalvo M, Lo Coco F, Amadori S. 2005. Apoptosis and immaturity in acute myeloid leukemia. *Hematology.* 1:25-34.
31. Devilee P, Cleton-Jansen AM, Cornelisse CJ. 2001. Ever since Knudson. *Trends Genet.* 17: 569-573.
32. El-Sherbiny YM, Cox MC, Ismail ZA, Shamsuddin AM, Vucenik I. 2001. G0/G1 arrest and S phase inhibition of human cancer cell lines by inositol hexaphosphate (IP₆). *Anticancer Res.* 21:2393-2403.
33. Engels FH, Koski GK, Bedrosian I, Xu S, Luger S, Nowell PC, Cohen PA, Czerniecki BJ. 1999. Calcium signaling induces acquisition of dendritic cell characteristics in chronic myelogenous leukemia myeloid progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:10332-10337.

34. Felsher DW, Bishop JM. 1999. Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol. Cell.* 4:199-207.
35. Felsher DW. 2004. Reversibility of oncogene-induced cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14:37-42.
36. Felsher DW, Bradon N. 2003. Pharmacological inactivation of MYC for the treatment of cancer. *Drug. News Perspect.* 16:370-374.
37. Fero ML, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, Kemp CJ. 1998. The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumor suppression. *Nature* 396:177-180.
38. Fesik SW. 2005. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat. Rev. Cancer.* 5:876-885.
39. Fisher GH, Wellen SL, Klimstra D, Lenczowski JM, Tichelaar JW, Lizak MJ, Whitsett JA, Koretsky A, Varmus HE. 2001. Induction and apoptotic regression of lung adenocarcinomas by regulation of a K-Ras transgene in the presence and absence of tumor suppressor genes. *Genes Dev.* 15:3249-3262.
40. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg SM, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP. 1986. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323:643-646.
41. Friend SH, Horowitz JM, Gerber MR, Wang XF, Bogenmann E., Li FP, Weinberg RA. 1987. Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: Organization of the sequence and its encoded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:9059-9063.
42. Galmarini CM, Popowycz F, Joseph B. 2008. Cytotoxic nucleoside analogues: different strategies to improve their clinical efficacy. *Curr. Med. Chem.* 15:1072-1082.
43. Gangopadhyay SB, Abraham J, Lin YP, Benchimol S. 1997. The tumour suppressor gene p53. In Peters G, Vousden KH. (szerk.). *Oncogenes and Tumor Suppressors*, *Front. in Molec. Biology.* 19:261-291.

44. Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN. 2000. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:653-699.
45. Greaves M. 2000. *Cancer: The evolutionary legacy*. Oxford University Press, Oxford, UK.
46. Gunther EJ, Moody SE, Belka GK, Hahn KT, Innocent N, Dugan KD, Cardiff RD, Chodosh LA. 2003. Impact of p53 loss on reversal and recurrence of conditional Wnt-induced tumorigenesis. *Genes Dev.* 17:488-501.
47. Hanakahi LA, Bartlett-Jones M, Chappell C, Pappin D, West SC. Binding of inositol phosphate to DNA-PK and stimulation of double-strand break repair. 2000. *Cell.* 102:721-729.
48. Harland BF, Oberleas D. 1987. Phytate in foods. *World Rev. Nutr. Diet.* 52: 235-259.
49. Hazlehurst LA, Bewry NN, Nair RR, Pinilla-Ibarz J. 2009. Signaling networks associated with BCR-ABL-dependent transformation. *Cancer Control.* 16:100-107.
50. Heldin CH, Westermark B. 1999. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev.* 79: 1283-1316.
51. Horowitz JM, Park SH, Bogenmann E, Cheng JC, Yandell DW, Kaye FJ, Minna JD, Dryja TP, Weinberg RA. 1990. Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 2775-2779.
52. Howe JR, Roth S, Ringold JC, Summers RW, Jarvinen HJ, Sistonen P, Tomlinson IP, Houlston RS, Bevan S, Mitros FA, Stone EM, Aaltonen AM. 1998. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science* 280:1086-1088.
53. Huang C, Ma WY, Hecht SS, Dong Z. 1997. Inositol hexaphosphate inhibits cell transformation and activator protein 1 activation by targeting phosphatidylinositol-3' kinase. *Cancer Res.* 57:2873-2878.

54. Ilyin GP, Langouet S, Rissel M, Delcros JG, Guillouzo A, Guguen-Guillouzo C. 1998. Ribavirin inhibits protein synthesis and cell proliferation induced by mitogenic factors in primary human and rat hepatocytes. *Hepatology*. 27:1687-1694.
55. Inoue K, Zindy F, Randle DH, Rehg JE, Sherr CJ. 2001. Dmp1 is haplo-insufficient for tumor suppression and modifies the frequencies of Arf and p53 mutations in Myc-induced lymphomas. *Genes Dev*. 15:2934-2939.
56. Jackson RC, Weber G. 1976. Enzyme pattern directed chemotherapy. The effects of combinations of methotrexate, 5-fluorodeoxyuridine and thymidine on rat hepatoma cells in vitro. *Biochem. Pharmacol*. 23:2613-2618.
57. Jagadeesh S, Banerjee PP. 2006. Inositol hexaphosphate represses telomerase activity and translocates TERT from the nucleus in mouse and human prostate cancer cells via the deactivation of Akt and PKCalpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 349:1361-1367.
58. Jain M, Arvanitis C, Chu K, Dewey W, Leonhardt E, Trinh M, Sundberg CD, Bishop JM, Felsner DW. 2002. Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science* 297:102-104.
59. Joachimiak MP, Weissman JL, May BH. 2006. JColorGrid: software for the visualization of biological measurements. *BMC Bioinf*. 7:225.
60. Joksic G, Stankovic M, Vasic V, Cakar M, Jokanovic M. 2000. Influence of ribavirin on the micronucleus formation and in vitro proliferation of human lymphocytes. *Neoplasma*. 47:283-287.
61. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. 2002. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer* 2:301-310.
62. Karlsson A, Deb-Basu D, Cherry A, Turner S, Ford J, Felsner DW. 2003. Defective double-strand DNA break repair and chromosomal translocations by MYC overexpression. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 100:9974-9979.
63. Karmakar S, Banik NL, Ray SK. 2007. Molecular mechanism of inositol hexaphosphate-mediated apoptosis in human malignant glioblastoma T98G cells. *Neurochem Res*. 32:2094-2102.

64. Kast RE. 2002. Ribavirin in cancer immunotherapies: controlling nitric oxide helps generate cytotoxic lymphocyte. *Cancer Biol. Ther.* 1:626-630.
65. Kentsis A, Topisirovic I, Culjkovic B, Shao L, Borden KL. 2004. Ribavirin suppresses eIF4E-mediated oncogenic transformation by physical mimicry of the 7-methyl guanosine mRNA cap. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:18105-18110.
66. Kentsis A, Volpon L, Topisirovic I, Soll CE, Culjkovic B, Shao L, Borden KL. 2005. Further evidence that Ribavirin interacts with eIF4E. *RNA.* 11:1762-1766.
67. Kemp CJ, Donehower LA, Bradley A, Balmain A. 1993. Reduction of p53 gen dosage does not increase initiation or promotion but enhances malignant progression of chemically induced skin tumors. *Cell.* 74:813-822.
68. Kinzler KW, Vogelstein B. 1997. Gatekeepers and caretakers. *Nature.* 386:761-763.
69. Kinzler KW, Vogelstein B. 1998. Landscaping the cancer terrain. *Science.* 280:1036-1037.
70. Knudson AG. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68:820-823.
71. Knudson AG. 1996. Hereditary cancer: two hits revisited. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122:135-140.
72. Knudson AG. 2000. Chasing the cancer demon. *Annu. Rev. Genet.* 34:1-19.
73. Knudson AG. 2001. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 1:157-162.
74. Kopper L., Timár J. 2007. *Molekuláris Onkológia, Semmelweis Kiadó.*
75. Kökény Sz, Papp J, Weber G, Vaszkó T, Carmona-Saez P, Oláh E. 2009. Ribavirin acts via multiple pathways in inhibition of leukemic cell proliferation. *Anticancer Res.* (in press)
76. Krengel U, Schlichting L, Scherer A, Schumann R, Frech M, John J, Kabsch W, Pai EF, Wittinghofer A. 1990. Three-dimensional structures of H-ras p21 mutants: molecular basis for their inability to function as signal switch molecules. *Cell.* 62:539-548.

77. Kroemer G, Pouyssegur J. 2008. Tumor cell metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell*. 13:472-482.
78. Kwok S, Higuchi R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature*. 339:237-238.
79. Lane, D. P. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 358:15-16.
80. La Thangue NB. 1997. The retinoblastoma gene product and its relatives. In Peters G, Vousden KH. (szerk.). *Oncogenes and Tumor Suppressors*, Front. in Mol. Biol. 19:233-259.
81. Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. 2001. The BCR gene philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res*. 61:2343-2355.
82. Lee HJ, Lee SA, Choi H. 2005. Dietary administration of inositol and/or inositol-6-phosphate prevents chemically-induced rat hepatocarcinogenesis. *Asian. Pac. J. Cancer Prev*. 6:41-47.
83. Lewin B. (szerk) - *Genes V.* / 1994. Chapter 39.
84. Li W, Shen F, Weber G. 1999. Ribavirin and quercetin synergistically downregulate signal transduction and are cytotoxic in human ovarian carcinoma cells. *Oncol. Res*. 11:243-247.
85. Livak J, Schmittgen S. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{DDCT} Method. *Methods*. 25: 402-408.
86. Lozzio CB, Lozzio BB. 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 45:321-334.
87. Lozzio BB, Lozzio CB. 1979. Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. *Leuk. Res*. 3:363-370.
88. Lynch ED, Ostermeyer EA, Lee MK, Arena JF, Ji H, Dann J, Swisshelm K, Suchard D, MacLeod PM, Kvinnsland S, Gjertsen BT, Heimdal K, Lubs H, Moller P, King MC. 1997. Inherited mutations in PTEN that are associated with breast cancer, cowden disease, and juvenile polyposis. *Am. J. Hum. Genet*. 61:1254-1260.

89. Macleod K. 2000. Tumor suppressor genes. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 10:81-93.
90. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. (szerk) 1982. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory.
91. Maru Y. 2001. Molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Int. J. Hematol.* 73:308-322.
92. Mastrangelo D, De Francesco S, Di Leonardo A, Lentini L, Hadjistilianou T. 2008. The retinoblastoma paradigm revisited. *Med Sci Monit.* 14:RA231-240.
93. Mi H, Lazareva-Ulitsky B, Loo R, Kejariwal A, Vandergriff J, Rabkin S, Guo N, Muruganujan A, Doremiex O, Campbell MJ, Kitano H, Thomas PD. 2005. The PANTHER database of protein families, subfamilies, functions and pathways. *Nucleic Acids Res.* 33: D284-288.
94. Mielnicki LM, Asch HL, Asch BB. 2001. Genes, chromatin, and breast cancer: an epigenetic tale. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 6:169-182.
95. Morceau F, Dupont C, Palissot V, Borde-Chiche P, Trentesaux C, Dicato M, Diederich M. 2000. GTP-mediated differentiation of the human K562 cell line: transient overexpression of GATA-1 and stabilization of the gamma-globin mRNA. *Leukemia.* 14:1589-1597.
96. Morgan TM, Koreckij TD, Corey E. 2009. Targeted therapy for advanced prostate cancer: inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Curr. Cancer Drug Targets.* 9:237-249.
97. Natsumeda Y, Yamada Y, Yamaji Y, Weber G. 1988. Synergistic cytotoxic effect of tiazofurin and ribavirin in hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:321-327.
98. Nickel KP, Belury MA. 1999. Inositol hexaphosphate reduces 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced ornithine decarboxylase independent of protein kinase C isoform expression in keratinocytes. *Cancer Lett.* 140:105-111.

99. Nagai M, Natsumeda Y, Konno Y, Hoffman R, Irino S, Weber G. 1991. Selective up-regulation of type II inosine 5'-monophosphate dehydrogenase messenger RNA expression in human leukemias. *Cancer Res.* 51:3886-3890.
100. Nagai M, Natsumeda Y, Weber G. 1992. Proliferation-linked regulation of type II IMP dehydrogenase gene in human normal lymphocytes and HL-60 leukemic cells. *Cancer Res.* 52:258-261.
101. Nowell PC. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 194:23-28.
102. Nowell PC, Hungerford DA. 1960. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science.* 132:1197.
103. Ogawa K, Tashima M, Takeda Y, Sawai H, Toi T, Sawada H, Maruyama Y, Okuma M. 1995. Erythroid differentiation and growth inhibition of K562 cells by 2',5'-dideoxyadenosine: synergism with interferon-alpha. *Leuk. Res.* 19:749-755.
104. Oláh E. 1991. Molekuláris és biokémiai támadási pontok a daganatsejtek szaporodásának gátlásában. MTA Doktori Értekezés Tézisei.
105. Oláh E. 2004. A DNS molekulától a betegágyig: a molekuláris medicina hídja. *Magy. Tud.* 5:582-592.
106. Oláh E. 2006. Molekuláris onkológia a rákgenomika első évtizedében. *Magy. Tud.* 3: 276-285
107. Oláh E. 2007. A genetika helye a daganatok gyógykezelésében. *MOTESZ Magazin.* 1-4.
108. Oláh E. 2007. Örökletes rákok. (Tankönyv fejezet) Tulassay Zs. (szerk.): A belgyógyászat alapjai. *Medicina Kiadó.* 1659-1663.
109. Oláh E. 2009. Molekuláris onkogenetika. (Tankönyv fejezet) Kásler M. (szerk.): *Klinikai Onkológia.* Medicina Kiadó. Megjelenés alatt.
110. Olah E, Natsumeda Y, Ikegami T, Kote Z, Horanyi M, Szelenyi J, Paulik E, Kremmer T, Hollan SR, Sugar J, Weber G. 1988. Induction of erythroid

- differentiation and modulation of gene expression by tiazofurin in K562 leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:6533-6537.
111. Olah E, Ezer R, Giaretti W, Eble J. 1989. Metabolic control of oncogene expression. *Biochem. Soc. Trans.* 18:72-74.
 112. Olah E, Kote Z, Natsumeda Y, Yamaji Y, Jarai G, Lapis E, Financsek I, Weber G. 1990. Down-regulation of MYC and c-Ha-ras gene expression by tiazofurin in rat hepatoma cells. *Cancer Biochem. Biophys.* 11: 107-117.
 113. Olah E, Csokay B, Prajda N, Kote-Jarai Z, Yeh YA, Weber G. 1996. Molecular mechanisms in the antiproliferative action of taxol and tiazofurin. *Anticancer Res.* 16: 2469-2477.
 114. Olah E, Kokeny Sz, Papp J, Bozsik A, Keszei M. 2006. Modulation of cancer pathways by inhibitors of guanylate metabolism. *Adv. Enzyme Reg.* 46:176-190.
 115. Olschwang S, Serova-Sinilnikova OM, Lenoir GM, Thomas G. 1998. PTEN germ-line mutations in juvenile polyposis coli. *Nat. Genet.* 18:12-14.
 116. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 74: 609-619.
 117. Oyan AM, Bø TH, Jonassen I, Ulvestad E, Tore Gjertsen B, Bruserud O, Kalland KH. 2007. Global gene expression in classification, pathogenetic understanding and identification of therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 8:344-54.
 118. Parsons R. 1997. Molecular genetics and hereditary cancer. Hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma as a model. *Cancer.* 80:533-536.
 119. Pelengaris S, Khan M. 2003. The many faces of MYC. *Arch. Biochem. Biophys.* 416:129-136.
 120. Phillippy Q, Graf E. 1996. Antioxidant functions of inositol 1,2,3/trisphosphate and inositol 1,2,3,6-tetrakisphosphate. *Free Rad. Biol. and Med.* 22:939-97.

121. Peter M, Rosty C, Couturier J, Radvanyi F, Teshima H, Sastre-Garau X. 2006. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene*. 25:5985-5993.
122. Peters G, Vousden KH. (szerk.) 2001. *Oncogenes and Tumor Suppressors*, Front. in Mol. Biol., Oxford University Press, Oxford, UK.
123. Polo S, Almouzni G. 2005. Histone metabolic pathways and chromatin assembly factors as proliferation markers. *Cancer Lett*. 220:1-9.
124. Prajda N, Hata Y, Abonyi M, Singhal RL, Weber G. 1993. Sequential impact of tiazofurin and ribavirin on the enzymic program of the bone marrow. *Cancer Res*. 53:5982-5986.
125. Rangatia J, Bonnet D. 2006. Transient or long-term silencing of BCR-ABL alone induces cell cycle and proliferation arrest, apoptosis and differentiation. *Leukemia*. 20:68-76.
126. Roy S, Gu M, Ramasamy K, Singh RP, Agarwal C, Siriwardana S, Sclafani RA, Agarwal R. 2009. p21/Cip1 and p27/Kip1 Are essential molecular targets of inositol hexaphosphate for its antitumor efficacy against prostate cancer. *Cancer Res*. 69:1166-1173.
127. Riely GJ, Marks J, Pao W. 2009. KRAS Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer. *Proc Am Thorac Soc*. 6:201-205.
128. Saied I, Shamsuddin AM. 1998. Up-regulation of the tumor suppressor gene p53 and WAF1 gene expression by IP6 in HT-29 human colon carcinoma cell line. *Anticancer Res*. 18:1479-1484.
129. Sakamoto K, Venkatraman G, Shamsuddin AM. 1993. Growth inhibition and differentiation of HT-29 cells in vitro by inositol hexaphosphate (phytic acid). *Carcinogenesis*. 14:1815-1818.
130. Saussoy P, Vaerman JL, Straetmans N, Deneys V, Cornu G, Ferrant A, Latinne D. 2004. Differentiation of acute myeloid leukemia from B- and T-lineage acute lymphoid leukemias by real-time quantitative reverse transcription-PCR of lineage marker mRNAs. *Clin. Chem*. 50:1165-1173.

131. Schlosser SF, Schuler M, Berg CP, Lauber K, Schulze-Osthoff K, Schmahl FW, Wesselborg S. 2003. Ribavirin and alpha interferon enhance death receptor-mediated apoptosis and caspase activation in human hepatoma cells. *Antimicrob. Agent Chemother.* 47:1912-1921.
132. Shachaf CM, Felsher DW. 2005. Rehabilitation of cancer through oncogene inactivation. *Trends. Mol. Med.* 11:316-321.
133. Shamsuddin AM, Baten A, Lalwani ND. 1992. Effect of inositol hexaphosphate on growth and differentiation in K-562 erythroleukemia cell line. *Cancer Lett.* 64:195-202.
134. Shamsuddin AM, Yang GY. 1995. Inositol hexaphosphate inhibits growth and induces differentiation of PC-3 human prostate cancer cells. *Carcinogenesis.* 16: 1975-1979.
135. Shamsuddin AM, Yang GY, Vucenik I. 1996. Novel anti-cancer functions of IP6: growth inhibition and differentiation of human mammary cancer cell lines in vitro. *Anticancer Res.* 16:3287-3292.
136. Shamsuddin AM, Vucenik I. 1999. Mammary tumor inhibition by IP6: a review *Anticancer Res.* 19:3733-3736.
137. Shears SB. 2001. Assessing the omnipotence of inositol hexakisphosphate. *Cell Signal.* 13:151-158.
138. Sidwell RW, Huffman JH, Khare GP, Allen LB, Witkowski JT, Robins RK. 1972. Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide. *Science.* 177:705-706.
139. Sikora K, Pandha H. 1997. Clinical relevance of oncogenes. Peters G, Vousden KH. (szerk.) *Oncogenes and Tumor Suppressors*, Front. in Mol. Biol. 19:315-328.
140. Singh RP, Agarwal C, Agarwal R. 2003. Inositol hexaphosphate inhibits growth, and induces G1 arrest and apoptotic death of prostate carcinoma DU145 cells: modulation of CDKI-CDK-cyclin and pRb-related protein-E2F complexes. *Carcinogenesis.* 24:555-563.

141. Somasundar P, Riggs DR, Jackson BJ, Cunningham C, Vona-Davis L, McFadden DW. 2005. Inositol hexaphosphate (IP6): a novel treatment for pancreatic cancer. *J. Surg. Res.* 126:199-203.
142. Song JH, Kim HJ, Lee CH, Kim SJ, Hwang SY, Kim TS. 2006. Identification of gene expression signatures for molecular classification in human leukemia cells. *Int. J. Oncol.* 29:57-64.
143. Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK. 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature.* 260:170-173.
144. Steinman RA, Hoffman B, Iro A, Guillouf C, Liebermann DA, el-Houseini ME. 1994. Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. *Oncogene.* 9:3389-3396.
145. Stratton MR, Futreal PA. 2004. Cancer: understanding the target. *Nature.* 430:30.
146. Subhashini J, Mahipal SVK, Reddanna P. 2005. Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia in vitro. *Cancer Lett.* 224:31-43.
147. Tantivejkul K, Vucenik I, Shamsuddin AM. 2003. Inositol hexaphosphate (IP6) inhibits key events of cancer metastasis: II Effects on integrins and focal adhesions. *Anticancer Res.* 23:3681-3689.
148. Taylor MW, Grosse WM, Schaley JE, Sanda C, Wu X, Chien SC, Smith F, Wu TG, Stephens M, Ferris MW, McClintick JN, Jerome RE, Edenberg HJ. 2004. Global effect of PEG-IFN-alpha and Ribavirin on gene expression in PBMC in vitro. *J Int. Cytokine Res.* 24:107-118.
149. Thijsen S, Schuurhuis G, van Oostveen J, Ossenkoppele G. 1999. Chronic myeloid leukemia from basics to bedside. *Leukemia.* 13:1646-1674.
150. Tkachuk, DC, Westbrook CA, Andreeff M, Donlon TA, Cleary ML, Suryanarayan K, Homge M, Redner A, Gray J, Pinkel D. 1990. Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogenous leukemia by in situ hybridization. *Science.* 250:559-562.

151. Topisirovic I, Guzman ML, McConnell MJ, Licht JD, Culjkovic B, Neering SJ, Jordan CT, Borden KL. 2003. Aberrant eukaryotic translation initiation factor 4E-dependent mRNA transport impedes hematopoietic differentiation and contributes to leukemogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 23:8992-9002.
152. Tzahar E, Yarden Y. 1998. The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands. *Biochim. Biophys. Acta.* 1377:M25-M37.
153. Vallee S, Fouchier F, Braguer D, Marvaldi J, Champion S. 2000. Ribavirin-induced resistance to heat shock, inhibition of the Ras–Raf-1 pathway and arrest in G₁. *Eur. J. Pharmacol.* 404:49-62.
154. van 't Veer L, Bernards R. 2008. Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature.* 452:564-570.
155. Vaque JP, Navascues J, Shiio Y, Laiho M, Ajenjo N, Mauleon I, Matallanas D, Crespo P, Leon J. 2005. Myc antagonizes Ras-mediated growth arrest in leukemia cells through the inhibition of the Ras-ERK-p21Cip1 pathway. *J. Biol. Chem.* 280:1112-1122.
156. Varmus H. 1989. Transgenic mice and host cell mutants resistant to transformation as model systems for identifying multiple components in oncogenesis. *Ciba. Found. Symp.* 142:20-26.
157. Venkatachalam S, Shi Y, Jones SN, Vogel H, Bradley A, Pinkel D, Donehower LA. 1998. Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *EMBO J.* 17:4657-4667.
158. Virág L, Szabó C. 2001. Purines inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activation and modulate oxidant-induced cell death. *FASEB J.* 15:99-107.
159. Vogelstein B, Feron FR, Hamilton SR. 1987. Clonal analysis using recombinant DNA probes from the X chromosome. *Cancer Res.* 47:4806-4813.
160. Vucenik I, Shamsuddin AM. 1994. [3H]inositol hexaphosphate (phytic acid) is rapidly absorbed and metabolized by murine and human malignant cells in vitro. *J. Nutr.* 124:861-868.

161. Vucenik I, Shamsuddin AM. 2003. Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: from laboratory to clinic. *J. Nutr.* 133:3778S-3784S.
162. Vucenik I, Tantivejkul K, Zhang ZS, Cole KE, Saied I, Shamsuddin AM. 1998. IP6 in treatment of liver cancer. IP6 inhibits growth and reverses transformed phenotype in HepG2 human liver cancer cell line. *Anticancer Res.* 18:4083-4090.
163. Vucenik I, Passaniti A, Vitolo MI, Tantivejkul K, Eggleston P, Shamsuddin AM. 2004. Anti-angiogenic activity of inositol hexaphosphate (IP6). *Carcinogenesis.* 25:2115-2123.
164. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr. 1996. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NFkappaB. *Science.* 274:784-787.
165. Wattenberg LW. 1999. Chemoprevention of pulmonary carcinogenesis by *myo*-inositol. *Anticancer Res.* 19:3659-3662.
166. Weber G. 1983. Enzymes of purine metabolism in cancer. *Clin. Biochem.* 16:57-63.
167. Weber G, Yamaji Y, Nagai M, Natsumeda Y, Jayaram HN, Zhen WN, Paulik E. 1990. Tiazofurin action in leukemia: evidence for down-regulation of oncogenes and synergism with retinoic acid. *Adv. Enzyme. Regul.* 30:35-45.
168. Weber G, Shen F, Yang H, Prajda N, Li W. 1999. Regulation of signal transduction activity in normal and cancer cells. *Anticancer Res.* 19:3703-3709.
169. Weber G, Shen F, Orban TI, Kokeny S, Olah E. 2003. Targeting signal transduction. *Adv. Enzyme. Regul.* 43:47-56.
170. Williams N. 2001. Evolutionary lessons for cancer biology. *Curr. Biol.* 11:R631-R632.
171. Willman CL. 2008. Has gene expression profiling improved diagnosis, classification, and outcome prediction in AML? *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 21:21-28.
172. Wong S, Witte ON. 2001. Modeling Philadelphia chromosome positive leukemias. *Oncogene.* 20:5644-5659.

173. Wright DG, Boosalis M, Malek K, Waraska K. 2004. Effects of the IMP-dehydrogenase inhibitor, Tiazofurin, in bcr-abl positive acute myelogenous leukemia. Part II. In vitro studies. *Leuk. Res.* 28:1137-1143.
174. Yamada Y, Natsumeda Y, Weber G. 1988. Action of the active metabolites of tiazofurin and Ribavirin on purified IMP dehydrogenase. *Biochemistry.* 27: 2193-2196.
175. Yamada Y, Goto H, Yoshino M, Ogasawara N. 1990. IMP dehydrogenase and action of antimetabolites in human cultured blast cells. *Bioch. Biophys. Acta.* 1051: 209-214.
176. York SJ, Armbruster BN, Greenwell P, Petes TD, York JD. 2004. Inositol diphosphate signaling regulates telomere length. *J. Biol. Chem.* 280:4264-4269.
177. Zenz T, Mohr J, Edelmann J, Sarno A, Hoth P, Heuberger M, Helfrich H, Mertens D, Dohner H, Stilgenbauer S. 2009. Treatment resistance in chronic lymphocytic leukemia: the role of the p53 pathway. *Leuk Lymphoma.* 50:510-513.
178. Zur Hausen, H. 1991. Viruses in human cancers. *Science.* 254:1167-1173.

Internetes elérhetőségek:

Panther Database: <http://www.pantherdb.org>

ImageJ software: <http://rsbweb.nih.gov/ij>

JColorGrid software: <http://jcolorgrid.ucsf.edu/>

WHO: www.who.itl

Eurostat: www.eurostat.com

GenMapp: www.genmapp.org

David: http://david.abcc.ncifcrf.gov/content.jsp?file=functional_annotation.html

MELLÉKLETEK

1. számú melléklet: A TLDA vizsgálatok során használt *assay*-k adatai

Sorszám	Gén azonosító	Génnev	ABI Assay azonosító
1.	18S	Eukaryotic 18S RNA	Hs99999901_s1
2.	ABL1	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	Hs00245445_m1
3.	AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	Hs00178289_m1
4.	APC	adenomatosis polyposis coli	Hs01568270_m1
5.	ATM	ataxia telangiectasia mutated	Hs00175892_m1
6.	ATR	ataxia telangiectasia and Rad3 related protein	Hs00169878_m1
7.	B2M	beta-2-microglobulin	Hs99999907_m1
8.	BAD	BCL2-antagonist of cell death	Hs00188930_m1
9.	BAX	BCL2-associated X protein	Hs00180269_m1
10.	BBC3/PUMA	BCL2 binding component 3	Hs00248075_m1
11.	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Hs00153350_m1
12.	BID	BH3 interacting domain death agonist	Hs00609632_m1
13.	BIRC5/Survivin	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	Hs00153353_m1
14.	CASP10	caspase 10	Hs00154268_m1
15.	CASP1	caspase 1	Hs00354836_m1
16.	CASP2	caspase 2	Hs00154242_m1
17.	CASP3	caspase 3	Hs00234387_m1
18.	CASP6	caspase 6	Hs00154250_m1
19.	CASP7	caspase 7	Hs00169152_m1
20.	CASP8	caspase 8	Hs01018151_m1
21.	CASP9	caspase 9	Hs00154260_m1
22.	CCND1	Cyclin D1	Hs00277039_m1
23.	CCNE1	Cyclin E1	Hs00233356_m1
24.	CD19	CD19 molecule	Hs00174333_m1
25.	CD3E	CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)	Hs01062241_m1
26.	CD79A	CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha	Hs00233566_m1
27.	CDKN1A/p21CIP1	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	Hs00355782_m1
28.	CDKN1B/p27KIP1	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	Hs00153277_m1
29.	CDKN2A/p14ARF/p16INK4A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	Hs00233365_m1
30.	CDKN2B/p15INK4B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	Hs00793225_m1
31.	CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	Hs00176236_m1
32.	CHEK2	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)	Hs00200485_m1
33.	CRADD/RIP	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	Hs00187009_m1

34.	CREB1	cAMP responsive element binding protein 1	Hs00231713_m1
35.	CTNNB1	catenin beta 1	Hs00170025_m1
36.	EIF2A	eukaryotic translation initiation factor 2A	Hs00230684_m1
37.	EIF2B1	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1 alpha	Hs00426752_m1
38.	EIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E	Hs00908915_g1
39.	EIF4G1	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma	Hs00191933_m1
40.	EPHB1/ELK	EPH receptor B1	Hs00174725_m1
41.	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	Hs00538709_m1
42.	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	Hs00163653_m1
43.	FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	Hs00170630_m1
44.	FRAP1/MTOR	FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1	Hs00234522_m1
45.	GMPS	Guanine monophosphate synthetase	Hs00269500_m1
46.	GRAP2/p38	GRB2-related adaptor protein 2	Hs00191325_m1
47.	GRB2	growth factor receptor-bound protein 2	Hs00157817_m1
48.	GUSB	glucuronidase, beta	Hs99999908_m1
49.	HBB	hemoglobin, beta	Hs00758889_s1
50.	HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit	Hs00936368_m1
51.	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	Hs99999909_m1
52.	HRAS	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	Hs00610483_m1
53.	HSPB2	heat shock 27kDa protein 2	Hs00155436_m1
54.	IFNAR1	interferon (alpha, beta and omega) receptor 1	Hs00265057_m1
55.	IFNAR2	interferon (alpha, beta and omega) receptor 2	Hs01022059_m1
56.	IGF1	insulin-like growth factor 1	Hs00153126_m1
57.	IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	Hs00609566_m1
58.	IL1R1	interleukin 1 receptor, type I	Hs00991002_m1
59.	IMPDH1	IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 1	Hs00265302_m1
60.	IMPDH2	IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 2	Hs00168418_m1
61.	ITGA1	integrin, alpha 1	Hs00235006_m1
62.	ITGB1	integrin, beta 1	Hs00236976_m1
63.	JAK1	Janus kinase 1	Hs00233820_m1
64.	KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	Hs00364282_m1
65.	MAPK8/JNK	mitogen-activated protein kinase 8	Hs00177083_m1
66.	MDM2	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein	Hs01066938_m1

67.	MPO	Myeloperoxidase	Hs00165162_m1
68.	MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	Hs00153408_m1
69.	NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	Hs00765730_m1
70.	NFKB2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	Hs00174517_m1
71.	NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	Hs00153283_m1
72.	PAK1	p21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1 (STE20 homolog, yeast)	Hs00176815_m1
73.	PARP1	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1	Hs00242302_m1
74.	PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (p85 alpha)	Hs00381459_m1
75.	PMAIP1/NOXA	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	Hs00560402_m1
76.	PRKARIA/PKA	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha (tissue specific extinguisher 1)	Hs00267597_m1
77.	PRKCA/PKC	protein kinase C, alpha	Hs00176973_m1
78.	PXN	Paxillin	Hs00236064_m1
79.	RAC1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)	Hs00251654_m1
80.	RAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	Hs00234119_m1
81.	RB1	retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)	Hs00153108_m1
82.	RHOA	ras homolog gene family, member A	Hs00357608_m1
83.	RPLP0	ribosomal protein, large, P0	Hs99999902_m1
84.	SOS1	son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	Hs00362308_m1
85.	STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	Hs00234829_m1
86.	STK11	Serine/threonine kinase 11	Hs00176092_m1
87.	TERT	telomerase reverse transcriptase	Hs00162669_m1
88.	TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	Hs00174128_m1
89.	TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	Hs01042313_m1
90.	TP53	tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	Hs00153349_m1
91.	TPPP/GSK3	brain-specific protein p25 alpha	Hs00389316_m1
92.	TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain	Hs00182558_m1
93.	TSC1	tuberous sclerosis 1	Hs00184423_m1
94.	TSC2	tuberous sclerosis 2	Hs00241068_m1
95.	VEGF	vascular endothelial growth factor	Hs00900054_m1
96.	YWHAB	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide (14-3-3)	Hs00793604_m1

2. melléklet: Kis dózisu (15µM) Ribavirin kezelés által jelentősen aktiválódott vagy csökkent mRNS szintekkel rendelkező gének, a *microarray* kísérleti eredmények ún. *fold change* értékei (példák, a PANTHER adatbázis felosztása alapján)

Gén szimbólum	RefSeq Azonosító	Génnev	Génexpresszió	
			Fel	Le
Onkogének, sejtciklus szabályozó gének				
CD33	NM_001772	CD33 antigen (gp67) (CD33), mRNA	2.6	
CDKN1C	NM_000076	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2) (CDKN1C), mRNA	2.5	
CDC20	NM_001255	CDC20 cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae) (CDC20), mRNA		- 3.7
IGF1R	NM_000875	insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R), mRNA		- 3.6
TIEG	NM_005655	TGFB inducible early growth response (TIEG), mRNA		- 3.4
GTPáz szabályozó aktivitással rendelkező gének				
VAV1	NM_005428	vav 1 oncogene (VAV1), mRNA	2.8	
GPS1	NM_004127	G protein pathway suppressor 1	2.2	
ARHGAP4	NM_001666	Rho GTPase activating protein 4 (ARHGAP4), mRNA	2.0	
BCAR3	NM_003567	breast cancer anti-estrogen resistance 3 (BCAR3), mRNA		- 2.3
Kináz aktivitással rendelkező gének				
ITPKA	NM_002220	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A (ITPKA), mRNA	2.3	
PKN3	NM_013355	protein kinase N3 (PKN3), mRNA		- 3.9
“Immunválasz”-gének				
BST2	NM_004335	bone marrow stromal cell antigen 2 (BST2), mRNA	4.5	
CCR7	NM_001838	chemokine (C-C motif) receptor 7 (CCR7), mRNA		- 3.4

Gén szimbólum	RefSeq Azonosító	Génnev	Génexpresszió	
			Fel	Le
GTP kötő doménnel rendelkező gének				
EEF2	NM_001961	eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2), mRNA	3.6	
L38995	L38995	nuclear-encoded mitochondrial elongation factor Tu mRNA	2.8	
GNL1	NM_005275	guanine nucleotide binding protein-like 1 (GNL1), mRNA	2.0	
AJ292757	AJ292757	TUBB1 gene for human beta tubulin 1, class VI		- 2.7
Transzkripciót szabályozó gének				
RUVBL2	NM_006666	RuvB-like 2 (E. coli) (RUVBL2), mRNA	2.5	
TIEG	NM_005655	TGFB inducible early growth response (TIEG), mRNA		- 3.4
Transzlációt szabályozó gének				
AARS	NM_001605	alanyl-tRNA synthetase (AARS), mRNA	3.0	
RPL10A	NM_007104	ribosomal protein L10a (RPL10A), mRNA		- 3.6
RPS20	NM_001023	ribosomal protein S20 (RPS20), mRNA		- 2.2
Anyagcsere útvonalak génjei, Szénhidrát-anyagcsere				
IDH2	NM_002168	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial (IDH2), mRNA	5.2	
IDH1	NM_005896	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble (IDH1), mRNA	2.7	
BPGM	NM_001724	2,3-bisphosphoglycerate mutase (BPGM), transcript variant 1, mRNA		- 2.0
Szignalizációs doménnel rendelkező gének				
YARS	NM_003680	tyrosyl-tRNA synthetase (YARS), mRNA	3.1	
IRAK1	NM_001569	interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1), mRNA	2.4	
GNG5	NM_005274	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 5 (GNG5), mRNA		- 2.2

3. melléklet: Az IP6 (5 mM) kezelés által jelentősen aktiválódott vagy csökkent mRNS szintekkel rendelkező gének, a *microarray* kísérleti eredmények ún. *fold change* értékei (példák, a PANTHER adatbázis felosztása alapján)

Gén szimbólum	RefSeq Azonosító	Génnev	Génexpresszió	
			Fel	Le
Onkogének				
MYC	NM_002467	Homo sapiens v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) (MYC)		- 1.2
MLLT2	NM_005935	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 2		- 10.3
PTTG2	NM_006607	pituitary tumor-transforming 2		- 11.9
KRAS2	NM_033360	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog		- 5.2
NRAS	NM_002524	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog		- 6.2
MERTK	NM_006343	Homo sapiens c-mer proto-oncogene tyrosine kinase (MERTK),		- 1.9
E2F1	NM_005225	Homo sapiens E2F transcription factor 1 (E2F1)		- 1.5
ELK1	NM_005229	Homo sapiens ELK1, member of ETS oncogene family (ELK1),		- 2.2
VAV1	NM_005428	vav 1 oncogene	1.4	
MAFK	NM_002360	Homo sapiens v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog K (avian) (MAFK)		- 1.9
CDKN1C	NM_000076	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2) (CDKN1C)		- 2.4
BC002646	BC002646	Homo sapiens v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)		- 1.7
FZD2	NM_001466	Homo sapiens frizzled homolog 2 (Drosophila) (FZD2)		- 2.5
Transzkripció				
BC006322	BC006322	Homo sapiens activating transcription factor 3		- 2.8
M62760	M62760	Homo sapiens chick ovalbumin upstream promoter transcription factor II (COUP-TFII)		- 1.8
ATF4	NM_001675	Homo sapiens activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67) (ATF4), transcript variant 1		- 1.4

Gén szimbólum	RefSeq Azonosító	Génnev	Génexpresszió	
			Fel	Le
Insulin-IGF, TGF-beta és PI3K útvonal				
GSK3A	NM_019884	glycogen synthase kinase 3 alpha	1.4	
FOXO1	NM_004472	forkhead box D1		- 9.2
FOXQ1	NM_033260	forkhead box Q1		- 10.8
FOXO3	NM_012183	forkhead box D3		- 4.0
INPPL1	NM_001567	inositol polyphosphate phosphatase-like 1		- 3.0
FOXC2	NM_005251	forkhead box C2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1)		- 9.1
FOXO1	NM_012182	forkhead box B1		- 5.0
ACVR1B	NM_004302	activin A receptor, type IB		- 1.7
GDF15	NM_004864	growth differentiation factor 15		- 1.6
RAC2	NM_002872	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)		- 1.6
AMH	NM_000479	anti-Mullerian hormone		- 4.8
RAB1B	NM_030981	RAB1B, member RAS oncogene family		- 1.6
RAB35	NM_006861	RAB35, member RAS oncogene family		- 1.6
BMP8A	NM_181809	bone morphogenetic protein 8a		- 15.0
GRB2	NM_002086	growth factor receptor-bound protein 2		- 1.6
GADD45A	NM_001924	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha		- 1.3
BCL2	NM_000657	B-cell CLL/lymphoma 2		- 4.5

Gén szimbólum	RefSeq Azonosító	Génnév	Génexpresszió	
			Fel	Le
Wnt útvonal				
PPP2R5C	NM_178588	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), gamma isoform		- 7.6
PLCB3	NM_000932	phospholipase C, beta 3 (phosphatidylinositol-specific)		- 9.6
HOXB7	NM_004502	homeo box B7		- 14.4
CTNNA3	NM_013266	catenin (cadherin-associated protein), alpha 3		- 1.6
CTNNB1	NM_001904	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa		- 7.4
FZD5	NM_003468	frizzled homolog 5 (Drosophila)		- 8.1
NFATC1	NM_172387	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1		- 11.9
CDH13	NM_001257	cadherin 13, H-cadherin (heart)		- 8.4
PPP3R2	NM_147180	protein phosphatase 3 (formerly 2B), regulatory subunit B, 19kDa, beta isoform (calcineurin B, type II)	2.6	
X07109	X07109	protein kinase C, beta 1		- 9.1
EGF és FGF útvonal				
STAT6	NM_003153	signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced	1.6	
PRKCZ	NM_002744	protein kinase C, zeta	1.5	
MAP3K5	NM_005923	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	1.6	
X07109	X07109	protein kinase C, beta 1	1.3	

Gén szimbólum	RefSeq Azonosító	Génnév	Génexpresszió	
			Fel	Le
Apoptózis				
BC028013	BC028013	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (avian)	2.4	
NFKBIA	NM_020529	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	3.7	
MAP3K5	NM_005923	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	1.6	
X07109	X07109	protein kinase C, beta 1	1.3	
PML	NM_002675	promyelocytic leukemia	2.5	
CDKN2D	NM_001800	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	1.4	
AMID	NM_032797	apoptosis-inducing factor (AIF)-like mitochondrion-associated inducer of death	1.4	
DAXX	NM_001350	death-associated protein 6		- 1.5
HSPA8	NM_153201	heat shock 70kDa protein 8		- 1.7
HSPA1A	NM_005345	heat shock 70kDa protein 1A		- 1.6
ATF4	NM_001675	activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)		- 1.7

Gén szimbólum	RefSeq Azonosító	Génnev	Génexpresszió	
			Fel	Le
Immunválasz, gyulladásási folyamatok				
CXCL1	NM_001511	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma stimulating growth activity, alpha)	7.1	
CXCL2	NM_002089	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	5.1	
IER3	NM_003897	immediate early response 3 (IER3), transcript variant short, mRNA	1.9	
IER5	NM_016545	immediate early response 5 (IER5), mRNA	1.4	
PILRB	NM_175047	paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta (PILRB)	1.3	
IL27RA	NM_004843	interleukin 27 receptor, alpha (IL27RA), mRNA	1.7	
IL23A	NM_016584	interleukin 23, alpha subunit p19 (IL23A), mRNA	1.6	
CKLFSF3	NM_144601	chemokine-like factor super family 3 (CKLFSF3),	1.4	
JUNB	NM_002229	jun B proto-oncogene	1.4	
BC028013	BC028013	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	2.4	
NFKBIA	NM_020529	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	3.7	
STAT6	NM_003153	signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced	1.6	
IL8	NM_000584	interleukin 8	3.3	
NFATC1	NM_172387	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	1.4	
BCL3	NM_005178	B-cell CLL/lymphoma 3	2.5	
MAPK1	NM_138957	mitogen-activated protein kinase 1		- 1.4
CD69	NM_001781	Homo sapiens CD69 antigen (p60, early T-cell activation antigen)	5.6	

Gén szimbólum	RefSeq Azonosító	Génnév	Génexpresszió	
			Fel	Le
Angiogenezis				
WNT10A	NM_025216	wingless-type MMTV integration site family, member 10A		- 1.9
LYN	NM_002350	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog		- 1.6
BC002646	BC002646	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)		- 1.8
PRKCZ	NM_002744	protein kinase C, zeta	1.5	
DVL1	NM_181870	dishevelled, dsh homolog 1 (Drosophila)		- 1.5
SPHK1	NM_021972	sphingosine kinase 1		- 1.3
PXN	NM_002859	paxillin		- 1.3
MAPK1	NM_138957	mitogen-activated protein kinase 1		- 1.4

4. melléklet: Nagy dózisu (50 μ M) Ribavirin kezelés által aktiválódott vagy csökkent mRNS szintekkel rendelkező gének idő-független génexpressziós változásai (*fold-change* értékek a TLDA kísérletek és a PANTHER adatbázis felosztása alapján)

Gén szimbólum	ABI Assay azonosító	Génnév	Gén-expresszió	
			Fel	Le
APOPTÓZIS				
Külső útvonal				
FAS	Hs00163653_m1	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)		-1.8
FADD	Hs00538709_m1	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain		-1.4
TNFRSF1A	Hs01042313_m1	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A		-1.6
BID	Hs00609632_m1	BH3 interacting domain death agonist		-1.6
TRADD	Hs00182558_m1	TNFRSF1A-associated via death domain	1.3	
CRADD/RIP	Hs00187009_m1	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	1.3	
NFKB1	Hs00765730_m1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)		-1.4
NFKB2	Hs00174517_m1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)	1.3	
NFKBIA	Hs00153283_m1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	1.3	
CASP10	Hs00154268_m1	caspase 10	2.1	
Belső útvonal				
BBC3/PUMA	Hs00248075_m1	BCL2 binding component 3	1.5	
PMAIP1/NOXA	Hs00560402_m1	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	1.4	
CASP2	Hs00154242_m1	caspase 2	1.4	
CASP9	Hs00154260_m1	caspase 9	1.3	
Közös útvonal				
CASP3	Hs00234387_m1	caspase 3	1.4	
CASP6	Hs00154250_m1	caspase 6	1.6	
CASP7	Hs00169152_m1	caspase 7	1.9	
DIFFERENCIÁCIÓ				
AKT1	Hs00178289_m1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1		-1.4
CD3E	Hs01062241_m1	CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)	1.5	
CD79A	Hs00233566_m1	CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha	1.3	
HBB	Hs00758889_s1	hemoglobin, beta	2.4	
MPO	Hs00165162_m1	myeloperoxidase	2.7	

ONKOGENEZIS			
ABL1	Hs00245445_m1	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	-1.9
CCND1	Hs00277039_m1	cyclin D1	-1.8
CCNE1	Hs00233356_m1	cyclin E1	-2.0
CDKN1A	Hs00355782_m1	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	1,5
CHEK1	Hs00176236_m1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	-1.6
HRAS	Hs00610483_m1	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	-1.7
MDM2	Hs01066938_m1	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein	-1.4
MYC	Hs00153408_m1	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog	-2.0
PAK1	Hs00176815_m1	P21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1	-1.4
RB1	Hs00153108_m1	retinoblastoma 1	1.6
RHOA	Hs00357608_m1	ras homolog gene family, member A	1.3
TERT	Hs00162669_m1	telomerase reverse transcriptase	-2.5
TP53	Hs00153349_m1	tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	1.7
TSC1	Hs00184423_m1	tuberous sclerosis 1	2.1
TSC2	Hs00241068_m1	tuberous sclerosis 2	1.4
SEJTSZIGNALIZÁCIÓ			
ATM	Hs00175892_m1	ataxia telangiectasia mutated	1.3
CREB1	Hs00231713_m1	cAMP responsive element binding protein 1	1.3
CTNNB1	Hs00170025_m1	catenin beta	-1.6
HIF1A	Hs00936368_m1	hypoxia-inducible factor 1	1.4
HSPB2	Hs00155436_m1	heat shock 27kDa protein 2	1.7
IFNAR1	Hs00265057_m1	interferon receptor 1	-1.2
IL1R1	Hs00991002_m1	interleukin 1 receptor	1.4
JAK1	Hs00233820_m1	Janus kinase 1	1.4
MAPK8	Hs00177083_m1	mitogen-activated protein kinase 8	1.4
PRKCA	Hs00176973_m1	protein kinase C, alpha	-1.2
PXN	Hs00236064_m1	paxillin	1.2
STAT1	Hs00234829_m1	signal transducer and activator of transcription	1.3
TPPP/GSK3	Hs00389316_m1	brain-specific protein p25 alpha	2.3
VEGF	Hs00900054_m1	vascular endothelial growth factor	1.5
TRANSLÁCIÓ INICIÁCIÓ			
EIF2A	Hs00230684_m1	eukaryotic translation initiation factor 2A	-1.3
EIF2B1	Hs00426752_m1	eukaryotic translation initiation factor 2B	-1.5
EIF4G1	Hs00191933_m1	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1	-1.3

GUANILÁT ANYAGCSERE			
GMPS	Hs00269500_m1	guanine monphosphate synthetase	1.3
HPRT1	Hs99999909_m1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	1.3
IMPDH1	Hs00265302_m1	IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 1	-1.3
IMPDH2	Hs00168418_m	IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 2	-1.7
PARP1	Hs00242302_m1	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1	-1.4